

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III



TESIS DOCTORAL

**Estudio morfológico comparativo de algunos clones del
género Uronema en condiciones de cultivo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Blanca Pérez Uz

DIRECTOR:

Dimas Fernández-Galiano

Madrid, 2015

Madrid, 1993

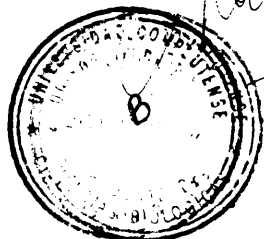
ESTUDIO MORFOLOGICO COMPARATIVO DE ALGUNOS
CLONES DEL GENERO URONEMA EN CONDICIONES DE
CULTIVO

Director:

Dr. Dimas Fernández-Galiano, Catedrático Emerito del
Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias
Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid

Tesis Doctoral que presenta
M. Blanca Perez Uz
para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Vº Bº Director:



Dr. Dimas Fernández-Galiano

R. 24567

A mi familia

Quiero expresar mi gratitud a las siguientes personas e instituciones:

- Al Dr. Dimas Fernández-Galiano que siempre me animó a la consecución de la tesis y puso su mejor empeño en arreglar todas mis cuestiones burocráticas.
- A Antonio Rosas por ser mi conciencia permanente durante la peor parte del proceso de "la tesis", y por la "gran" ayuda tanto moral como material en ideas, correcciones y múltiples discusiones
- A Genoveva Esteban por toda la eficiente y rápida ayuda en todas las correcciones y comentarios en la tesis, así como el apoyo moral.
- A Clive Montcrieff por toda la ayuda con el análisis estadístico de los datos y la utilización de Genstat.
- A Pat Dyal por actuar de profesora en los experimentos de hibridación molecular.
- A Martin Embley por permitir complacientemente la colaboración y el acceso a las instalaciones del laboratorio de biología molecular.
- A Sue Hope por la ayuda en el laboratorio con los "famosos" conteos y el cultivo de cilios.
- A Kent Clarke por la ayuda en la consecución de los cortes para microscopía electrónica de transmisión y por las discusiones sobre los resultados.
- A Bland Finlay por facilitar el acceso a las facilidades de microscopía electrónica en el IFE.
- A Alicia Soto por toda la ayuda, útiles comentarios, correcciones y compartir las vivencias en el extranjero.
- A Carmen Téllez por los ánimos y apoyo moral prestado.
- A Dave Roberts y Alan Warren por los útiles comentarios en la tesis, y por la ayuda para tratar de resolver los problemas que múltiples veces aparecieron a lo largo de la tesis.
- A mi "troop": Danilo de Calasanz, Olivier Decamp, Mary Spencer-Jones, Jim Chimonides, y

especialmente Vivian Tuffney, que durante tres años aguantaron mis lapsos de mal humor (para lo cual se necesita aguante), por la comprensión y la ayuda moral prestada.

- A todas las personas tanto del Dpto. de Zoología del NHM como de otras instituciones gracias a las que se recolectaron muestras de muy diversa procedencia mundial.
- A la unidad fotográfica del NHM de Londres..
- A la unidad de microscopía electrónica del NHM de Londres, especialmente a Sue Barnes.
- Al Departamento de Zoología del NHM de Londres y a toda la gente del Dpto. que de una u otra manera han hecho agradable y divertido el trabajar allí.
- Y por ultimo, pero no menos, a mi familia al completo que siempre ha estado ahí como apoyo y base de todo lo que yo he hecho, y en especial a las innumerables idas y venidas para arreglar papeleos de mis seguidores favoritos, mis hermanos Pedro y Alvaro.

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del problema	2
1.2. El concepto de especie	3
1.3. El estudio funcional del género <u>Uronema</u>	6
1.4. Técnicas morfométricas: análisis estadístico	9
1.5. Técnicas moleculares en la identificación	11
1.6. Objetivos del trabajo	12
2. ANTECEDENTES	16
2.1. El estudio del género <u>Uronema</u>	17
2.2. Morfología clásica: historia de <u>Uronema</u>	18
2.3. Morfología clásica: la llegada de las impregnaciones.	30
3. MATERIAL Y MÉTODOS	34
3.1. Medios de cultivo	35
3.1.1. Agua de mar	35
3.1.2. Agua mineral	36
3.1.3. Medios de cultivo bacterianos	36
3.1.4. Medios de cultivo de ciliados	37
3.2. Material biológico	38
3.2.1. Muestras	38
3.2.2. Bacterias	38
3.2.3. Ciliados	39
3.2.3.1. Escuticociliados marinos	40
3.2.3.2. Escuticociliados dulceacuícolas	43
3.2.3.3. Colección de cultivo	44
3.3. Estudio trofodinámico	47
3.3.1. Condiciones de cultivo	47

3.3.2. Curvas de calibrado	49
3.3.3. Estudio trofodinámico comparativo de los clones	
<u>U. marinum</u> y SRBM	51
3.4. Estudio morfológico	56
3.4.1. Microscopía óptica	56
3.4.1.1. Técnicas de Impregnación	60
Protargol	62
Técnica de Carbonato de plata amoniacal . .	60
Técnica de Chatton-Lwoff	61
3.4.1.2. Microscopios y video	65
3.4.1.3. Digitalización de imágenes: DIGIT . . .	66
3.4.2. Microscopía electrónica	70
3.4.2.1. Microscopía electrónica de barrido . .	70
3.4.2.2. Microscopía electrónica de transmisión	71
3.5. Hibridaciones con sonda molecular específica de	
<u>U. marinum</u>	72
3.6. Tratamientos estadísticos	75
4. RESULTADOS	78
4.1. Descripciones morfológicas	79
Uronema marinum (CCAP 1986/2)	88
Uronema schewiakoffi (CCAP 1986/1)	100
Parauronema acutum (CCAP)	105
Clon Ta	120
Clon X2	116
Clon AD1	124
Clon AD2	129
Clon AE21	133
Clon AE22	137
Clon SWI1	142
Clon Cill1	147
Clon BBCil	152

Clon Cil7	157
Clon Cil3	162
Clon SRBM	175
Clon Scut 2.1	184
 4.2. Estudio de las cinéticas de crecimiento	 189
4.2.1. Curvas de crecimiento	189
4.2.2. Estudio trofodinámico comparativo de dos clones de <u>U. marinum</u>	206
 4.3. Analisis morfométrico	 217
4.3.1. Efectos de las impregnaciones	217
4.3.1.1. Efectos cualitativos	218
Carbonato de plata amoniacal	218
Nitrato de plata	219
Protargol	220
4.3.1.2. Efectos biométricos	221
4.3.2. Diferencias entre fases de crecimiento	242
4.3.3. Identificación de especies: análisis estadístico	248
Clones en vivo	248
Técnica del protargol	252
Técnica de nitrato de plata	259
Técnica de carbonato de plata amoniacal	265
 4.4. Hibridaciones con la sonda molecular <u>U. marinum</u>	 271
 5. DISCUSIÓN	 274
5.1. Descripciones morfológicas clásicas	275
5.1.1. Microscopía óptica: impregnaciones	275
5.1.2. Microscopía electrónica de barrido y transmisión	315
 5.2. Estudio de las cinéticas de crecimiento	 322

5.2.1. Curvas de crecimiento	327
5.2.2. Estudio trofodinámico comparativo de dos clones de <u>U. marinum</u> y SRBM	330
5.3. Análisis morfométrico	335
5.3.1. Consideraciones sobre las impregnaciones . . .	337
5.3.1.1. Efectos cualitativos	338
Carbonato de plata amoniacal	338
Nitrato de plata	339
Protargol	341
5.3.1.2. Efectos cuantitativos	343
5.3.2. Diferencias entre las fases de crecimiento . .	345
5.3.3. Análisis estadístico multivariante	348
5.4. Hibridaciones con sonda molecular	352
5. CONCLUSIONES	356
6. BIBLIOGRAFIA	360

LAMINAS

ANEXO 1

ANEXO 2

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema

El estudio del género Uronema ha sido llevado a cabo principalmente desde dos puntos de vista: en primer lugar, su identificación taxonómica, incluyendo este punto tanto descripciones morfológicas como morfogenéticas y, en segundo lugar, en estudios experimentales de sus características trofodinámicas en cultivo, tanto estático (en batch) como en continuo.

El problema en la identificación de estos ciliados no sólo ha sido su pequeño tamaño, sino además la falta de una definición clara de alguna de sus especies. Bajo ciertas denominaciones específicas se han incluido descripciones muy diversas, interpretándose dicho polimorfismo como el resultado de su variabilidad geográfica. Sin embargo, el problema de identificar especies muy similares, aunque distintas, no es nuevo en la taxonomía de ciliados. Los casos más claros han sido los complejos de especies identificados en Paramecium (Sonneborn, T.M., 1975) y en Tetrahymena (Nanney, D.L., 1982; Nanney, D.L. y col., 1980), ambos ampliamente estudiados. En el caso de Uronema Thompson (Thompson, J.C., 1972) indica que sería aconsejable considerar todas las formas encontradas dentro de U. marinum como un complejo de especies. Sin embargo, hasta la fecha ningún trabajo se ha llevado a cabo desde este punto de vista. Así, uno de los objetivos considerados en este trabajo ha sido el estudio de la posible existencia de un complejo de especies en U. marinum. En este sentido, y como un primer paso en la investigación, se han tratado de identificar varios morfotipos discretos dentro de la variabilidad morfológica de esta especie.

La existencia de complejos de especies encierra un gran número de cuestiones concernientes a sus diferencias ecológicas y de cómo estas especies se mantienen en la naturaleza a pesar de la competencia por la explotación de

un medio con otras formas muy similares (Fenchel, T., 1987).

En este caso la aplicación de técnicas de biología molecular, han permitido concluir, que la persistente similitud morfológica en dichos complejos reside en su diseño morfológico primitivo, representando dicho fenotipo un pico adaptativo, en el que pequeñas desviaciones conducen a una recesión en la adaptación, de tal manera, que la selección natural ha disminuido la posibilidad de dichos cambios morfológicos hacia formas divergentes.

1.2. El concepto de especie

Debemos tener en cuenta el concepto de especie utilizado. Con respecto al concepto de especies "genéticas" o "evolutivas", pueden aparecer varios problemas interesantes. Muchos protozoos parecen carecen de "sexo", en dichas formas el concepto de especie no existe realmente, tal y como se plantea en organismos superiores. Esto no quiere decir que dichas formas asexuadas no aparezcan como grupos discretos con fenotipos característicos y ser capaces de denominarlas no sea posible o deseable. Sin embargo, este proceso no tiene significado evolutivo en el sentido de poblaciones compartiendo un mismo genotipo (gene pool).

En formas capaces de hibridar, sin embargo, el establecimiento de "especies biológicas" si tiene sentido. Este análisis fue aplicado por primera vez por Sonneborn (1957,1975) sobre el complejo de Paramecium aurelia y posteriormente sobre Tetrahymena pyriformis. En estos complejos de especies, los métodos tradicionalmente utilizados no permiten la definición de especies biológicas morfológicamente idénticas (especies gemelas), haciéndose necesaria la utilización de otras técnicas distintas para su identificación.

El caso del complejo de Paramecium aurelia fue estudiado por Sonneborn (1957,1975) (T.M. Sonneborn, 1975). Este autor demostró que 14 especies morfológicamente idénticas se encontraban aisladas genéticamente, siendo denominadas por este autor "syngens". Estudios más detallados sobre estos "syngens" demostraron que, aunque prácticamente idénticos, presentaban diferencias morfológicas que podían ser identificadas morfométricamente (Gates, M.A. y col., 1975; Powelson, E.E. y col., 1975) y ciertas diferencias ecológicas con respecto a preferencias de hábitat, características vitales y distribución geográfica.

Un sistema similar fue descrito por Nanney y colaboradores (D.L. Nanney, 1982; Nanney, D.L., 1989; D.L. Nanney, L.E. Coopers col., 1980) para Tetrahymena pyriformis. Hasta ahora dicho complejo consiste de 17 grupos aislados entre ellos, sin embargo, hay 4 clones asexuados amicronucleados caracterizados únicamente por su patrón de isoenzimas. Los demás son capaces de hibridar, verdaderas especies en el sentido biológico. Como en el caso de Paramecium, las especies muestran diferencias geográficas y morfométricas (Gates, M.A. y Berger, J., 1974; Gates, M.A. y Berger, J., 1976), sin embargo, son prácticamente imposibles de distinguir por medio de las técnicas de morfología clásica.

Estos dos ejemplos son clásicos en la utilización de otras técnicas distintas a los métodos tradicionalmente utilizados, cuando estos fallan en la definición de especies morfológicamente idénticas (especies gemelas). En este sentido, Corliss (Corliss, J.O., 1973) establece que el estudio de la variabilidad de aquellas especies de ciliados que presentan la fenomenología antes descrita, se basa en cuatro puntos principales:

(a).- El estudio de la ciliación, infraciliación y características corticales. Más en detalle, el número de

cinetias en todo el ciclo vital; presencia o ausencia de cilio caudal; número, distribución y localización de poros de la vacuola contráctil; etc.

(b).- Las características del ciclo vital como cantidad y grado de polimorfismo, tanto en condiciones de cultivo como en medios naturales, presencia o ausencia de quistes y tipo, clase de estomatogénesis, características del núcleo y de la división, presencia o ausencia de procesos sexuales, etc.

(c).- Datos ecológicos tales como las observaciones de hábitats naturales y experimentales, preferencias por cierto tipo de alimentos, características de crecimiento en cultivo en laboratorio, etc.

(d).- Propiedades fisiológicas o bioquímicas, incluyendo datos de estudios en laboratorio y experimentación, estudios de crecimiento, investigaciones metabólicas o aproximaciones de tipo molecular.

En el presente trabajo el estudio de diferentes clones (taxones) del género Uronema, se ha llevado a cabo como una aproximación comparativa de este tipo. Esto es, en primer lugar se ha considerado la aproximación tradicional o clásica al estudio de ciliados - la utilización de impregnaciones - para el estudio de la ciliación, infraciliación y características corticales, complementado con un estudio morfométrico por medio de análisis estadístico multivariante, que aunque útil en discriminación, no ha sido muy utilizado en el estudio taxonómicos de ciliados. El resto del estudio se ha enfocado en la utilización de otras aproximaciones que no son regularmente utilizadas en el estudio taxonómico, como características del ciclo vital o la consideración de datos ecológicos, principalmente en observaciones experimentales y por último la aplicación de sondas moleculares en la

identificación.

Estos puntos indicados son realmente importantes si se trata de llevar a cabo la identificación de subespecies o estirpes genéticas en los casos de complejos de especies (J.O. Corliss, 1973).

Para llevar a cabo este tipo de trabajo, el establecimiento de colecciones de cultivo es indispensable, lo cual para las especies de Uronema no ha sido mayor problema, ya que estos son organismos especialmente fáciles de mantener y utilizar en trabajos experimentales. La posibilidad de la obtención de muestras de muy diversa procedencia, para el aislamiento de clones de este género, ha sido favorecida por la amplitud mundial y movilidad en diversos proyectos llevados a cabo en el Dpt. de Zoología del Natural History Museum de Londres.

En los siguientes apartados se desarrollarán las diversas técnicas que se han utilizado sobre todos los clones aislados, cuáles son sus ventajas, y qué trabajos han sido llevados a cabo anteriormente.

1.3. El estudio funcional del género Uronema

Los estudios ecológicos, desde el punto de vista del taxónomo, incluyen principalmente la identificación sólo de las especies que se observan. Estos estudios sistemáticos se engloban dentro de lo que se denomina taxonomía α .

El estudio más detallado de subespecies, estirpes genéticas (syngens) o grupos de hibridación (mating types), grupos éstos útiles en estudios de evolución, necesitan normalmente otro tipo de técnicas, ya que en general estas especies, suelen ser morfológicamente idénticas. Estas

otras técnicas han incluido aparte de las normalmente utilizadas en la identificación: experimentos de hibridación, morfometría, patrones de isoenzimas, técnicas de biología molecular. Este tipo de estudio taxonómico, queda englobado dentro del denominado taxonomía β (Corliss, J.O., 1992).

Algunos trabajos, principalmente desarrollados por ecólogos, han propuesto el agrupamiento de taxones de acuerdo con una mezcla de información tanto trófica como taxonómica (Sieburth, J.M. y Estep, K.W., 1985). Estos sistemas funcionales no parecen haber tenido mucha aceptación, por lo menos desde un punto de vista taxonómico, principalmente por que sólo consideran taxones superiores de forma muy general. Sin embargo, la idea de considerar información taxonómica y suplementar esta con información funcional o trófica, puede ser de gran ayuda tanto para el taxónomo como para el ecólogo. Por un lado, al considerar en la identificación la información funcional, esta puede proveer datos sobre diferencias en el comportamiento de morfotipos en los mismos o distintos medios, lo cual a su vez es desde un punto de vista ecológico importante, en el sentido de que se provee información sobre la función que puede ser llevada a cabo por ese organismo en el ecosistema.

El presente trabajo se ha tratado de desarrollar en esta dirección, considerando un estudio englobado en el tipo de taxonomía β , incluyendo datos funcionales o tróficos de las estirpes estudiadas. Como datos funcionales se han considerado la tasa de crecimiento y la producción celular de los distintos clones, en las mismas condiciones de cultivo. Estos datos son importantes cuando se trata de evaluar el papel jugado por estos en medios naturales (Fenchel, T., 1968). El propósito de su estudio ha sido averiguar si la variabilidad morfológica o de procedencia de los clones presenta diferencias en el comportamiento

funcional de éstos.

La facilidad para el cultivo de las especies del género Uronema han hecho de estos ciliados organismos especialmente útiles en manipulaciones experimentales. El estudio de sus ciclos de vida y requerimientos en el medio han sido facilitados ya que sus poblaciones pueden ser estudiadas en pocas generaciones y en períodos de tiempo cortos (Fenchel, T., 1992).

Los estudios experimentales en organismos de este género sirvieron de base para otros estudios ecológicos. En este sentido, los aspectos que se han considerado se pueden enumerar como: 1) el posible papel jugado por estos ciliados en la regeneración de nutrientes en las cadenas tróficas marinas (Hamilton, R.D. y Preslan, J.E., 1969); 2) la utilización de este ciliado bacteriófago en estudios de dinámica de poblaciones, en modelos predador-presa en medios marinos (Ashby, R.E., 1976; Berk, S.G. y col., 1976; Parker, J.G., 1976; Taylor, W.D., 1978) y la interpretación de estos en condiciones naturales como predadores de bacterias (Gast, V., 1985; Ohman, M.D. y Snyder, R.A., 1991; Taylor, G.T. y col., 1985; Turley, C.M. y col., 1986) y 3) El estudio de los mecanismos de predación por filtración de partículas en suspensión, que es típica en estos ciliados (Fenchel, T., 1986).

Casi todos los estudios llevados a cabo sobre el comportamiento funcional de especies del género Uronema utilizan únicamente una especie: la especie Uronema marinum. Sin embargo, dicho género hoy en día incluye por lo menos cinco especies, de las que no se tiene prácticamente ningún dato funcional, excepto por la ya mencionada U. marinum (R.E. Ashby, 1976; R.D. Hamilton y J.E. Preslan, 1969; J.G. Parker, 1976; W.D. Taylor, 1978) o U. nigricans de la que sólo se ha encontrado un trabajo (S.G. Berk, R.R. Colwelly col., 1976). Los datos en estos

casos son difíciles de comparar debido a las diferentes condiciones de cultivo utilizadas en todos los experimentos.

Resulta igualmente sorprendente comprobar que no se haya llevado a cabo ningún estudio comparativo de la variabilidad funcional de estas especies, habida cuenta de la gran variedad de adaptaciones de los ciliados bacteriofagos, en la explotación de ambientes heterogéneos, tanto en el tiempo como en el espacio (Fenchel, T., 1990; T. Fenchel, 1992). Por ejemplo, la especie U. marinum se ha comprobado que está especialmente adaptada a la explotación de áreas de concentraciones bacterianas altas (T. Fenchel, 1968; V. Gast, 1985; Hamilton, R.D. y Preslan, J.E., 1970; Parker, J.G., 1978; G.T. Taylor, R. Iturriagay col., 1985; C.M. Turley, R.C. Newelly col., 1986). Por lo tanto, un estudio comparativo resultaría pertinente para comprobar si la procedencia o la similitud morfológica de dichas especies tiene alguna traducción en la funcionalidad en un medio ambiente concreto; o lo que es lo mismo, si los mecanismos trofodinámicos, que se asumen semejantes, realmente lo son.

Las poblaciones de ciliados pueden reaccionar a las concentraciones bacterianas presentes en el medio de distintas maneras, afectando a la producción celular o a las tasas de crecimiento. El empleo de estos parámetros no se ha llevado a cabo normalmente como una característica más a utilizar en el estudio taxonómico, pero esta información puede ser de gran valor en estudios ecológicos.

1.4. Técnicas morfométricas: análisis estadísticos.

El análisis y cuantificación de datos morfométricos, por medio de técnicas multivariantes, muy utilizados en descripción taxonómica de metazoos, ha sido poco utilizado

en estudios en protozoología. Aparte de la cuantificación o la toma de medidas y la aplicación de análisis univariantes (no discriminantes), ningún otro tipo de técnicas estadísticas son utilizadas normalmente para la discriminación entre organismos morfológicamente muy parecidos.

Los principales trabajos llevados a cabo con técnicas estadísticas de análisis multivariante en ciliados se reducen a los llevados a cabo, como ya se indicó anteriormente, sobre los complejos de Paramecium aurelia (M.A. Gates, E.E. Powelsony col., 1975; E.E. Powelson, M.A. Gatesy col., 1975) o sobre Tetrahymena pyriformis (M.A. GatesyJ. Berger, 1974; M.A. GatesyJ. Berger, 1976).

Entre los ejemplos de los estudios llevados a cabo con Tetrahymena pyriformis, destaca el primero de este tipo en el que se estudian datos de veinte variables morfológicas principalmente de estructuras bucales, y otros caracteres somáticos (M.A. GatesyJ. Berger, 1974). Este análisis, fue capaz de discriminar los diferentes clones estudiados, y se concluyó que estas técnicas podrían ser de mucha utilidad en la extracción de criterios morfológicos para la discriminación taxonómica entre "syngens" o estirpes genéticas.

Otros estudios similares se realizaron posteriormente sobre 22 stocks de cuatro especies idénticas del complejo de Paramecium aurelia, llevando a cabo el estudio biométrico extremadamente detallado de 20 caracteres morfológicos (M.A. Gates, E.E. Powelsony col., 1975; E.E. Powelson, M.A. Gatesy col., 1975). Estos resolvieron el problema de la identificación morfológica para P. primaurelia, P. biaurelia, P. tetraurelia y P. sexaurelia. Más tarde Gates y Berger (1976) realizando un trabajo detallado sobre Paramecium primaurelia y P. pentaurelia concluyeron que ambas especies son morfológicamente únicas

pero prácticamente inseparables. Se debe hacer notar que estas dos especies son inseparables, asimismo, por medio de análisis isoenzimático.

Estos estudios demuestran la validez e importancia que estudios estadísticos de análisis multivariantes, sobre caracteres morfológicos continuos, pueden tener en la discriminación de especies o complejos de especies donde la utilización de los caracteres convencionales, por medio de las impregnaciones, no llega a resolverlas. De hecho, para poder demostrar claramente la existencia de diferencias morfológicas entre especies idénticas (complejos de especies), cualquier unidad somática, orgánulo, estructura o complejo que pueda ser medido en relación con otras partes de la célula de la misma edad clonal para una especie dada pueden ser empleados (Wichterman, R., 1985).

Esta aproximación también ha sido empleada en este estudio, sobre todos los clones de Uronema aislados. Se han considerado principalmente tanto caracteres de las estructuras bucales, como caracteres somáticos que delimitan la situación de las estructuras bucales en la célula, en las fases de crecimiento exponencial y estacionaria, respectivamente.

1.5. Técnicas moleculares en la identificación

El estudio de las secuencias de áreas altamente variables o hipervariables en la molécula de rRNA, puede ser de gran valor en la identificación de especies morfológicamente muy similares (Nanney, D.L. y col., 1989; Pace, N.R. y col., 1986). Este tipo de estudios, sin embargo, no están todavía muy extendidos.

La utilización de la información molecular en el estudio de protistas, se ha llevado a cabo principalmente

en la resolución de problemas filogenéticos, que se han examinado utilizando secuencias relativamente variables de genes de rRNA (Embley, T.M. y col., 1992; Hillis, D.M. y Moritz, C., 1990; Nanney, D.L. y col., 1991; Sogin, M.L., 1991). Pocos casos existen en los que se haya utilizado esta variabilidad molecular comparativamente con morfología o en el problema de complejos de especies. El ejemplo, en este caso, como ocurrió con las otras aproximaciones explicadas en puntos anteriores, se refiere al género Tetrahymena (D.L. Nanney, 1989; Preparata, R.M. y col., 1989).

Los estudios de secuencias de las regiones más variables de los genes de rRNA, secuencias de evolución rápida más conocidas como "dominios divergentes" (divergent domains) o "segmentos de expansión" (expansion segments) son útiles en la investigación de divergencias evolutivas que han ocurrido en los pasados 500 millones de años. Estas regiones son útiles en la identificación de taxones a nivel específico.

En este estudio llevado a cabo con la sección de Biología Molecular del NHM, la secuenciación de una de estas áreas sobre el rRNA de la subunidad pequeña se llevó a cabo sobre uno de los clones - U. marinum (CCAP 1986/2) - que es el que se ha utilizado como referencia. Esta secuencia fue tomada como base para la síntesis de una sonda molecular, que una vez marcada convenientemente (fluorescentemente), se utilizó para la identificación de U. marinum. La utilización de esta sonda molecular, al hibridar específicamente con la secuencia concreta típica de dicha especie, que se utilizó como referencia, nos da una idea de la cercanía o lejanía de los distintos clones estudiados a ella.

Esta aproximación molecular en el estudio fue observada como una técnica más en la discriminación de los

clones aislados y en último término como medio de identificación de U. marinum.

1.6. Objetivos del trabajo

Por lo tanto, y teniendo en cuenta lo expuesto en los párrafos anteriores, uno de los principales objetivos de este trabajo ha sido el estudio de la posible existencia de un complejo de especies en U. marinum. Dicho objetivo se ha llevado a cabo por medio del estudio de dieciséis clones pertenecientes al género Uronema de diverso origen geográfico.

Se han considerado cuatro aproximaciones distintas al problema: la identificación clásica de los clones, los parámetros trofodinámicos obtenidos sobre estos, la identificación morfométrica por medio de análisis multivariante y la utilización de una sonda molecular específica para la identificación. Estos objetivos se desglosan en los siguientes puntos:

1.- La descripción morfológica de diferentes clones del género Uronema aislados de muestras de distinta procedencia geográfica. Se persigue el poder delimitar los tipos de variabilidad geográfica así como identificar los rangos de variabilidad en los taxones estudiados.

2.- La comparación morfológica entre clones considerando datos obtenidos tanto en fase de crecimiento exponencial como estacionaria así como las descripciones en la bibliografía, que hagan posible una clara identificación de las especies. Se han tenido en cuenta diferentes técnicas utilizadas normalmente en el estudio taxonómico de ciliados, esto es, las impregnaciones de nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff), carbonato de plata amoniacal y protargol, cuyos efectos, tanto cualitativos

como cuantitativos, se han tenido en cuenta.

3.- El estudio funcional de todos los clones aislados y clasificados en morfotipos. Se ha considerado el comportamiento trofodinámico en las mismas condiciones cultivo estático (en batch) para todos los clones, con la consecuente observación de variables tales como: tasas de crecimiento o producciones celulares características en dichas condiciones. El propósito de este estudio funcional del genero Uronema es comprobar si la variabilidad morfológica o de procedencia de los distintos clones permite establecer diferencias, asimismo, en los parámetros trofodinámicos.

4.- El estudio trofodinámico comparativo de dos de los clones pertenecientes a dos morfotipos (U. marinum y SRBM), con variaciones en las condiciones de cultivo. Se consideran única y exclusivamente los efectos de las variaciones en las concentraciones de alimento sobre el comportamiento predador de estos clones.

5.- El estudio de los efectos de las variaciones morfológicas en ambas fases de crecimiento (exponencial y estacionaria) sobre la posición o tamaño de las estructuras celulares utilizadas en el estudio morfológico. Se trata de determinar si el incremento en el volumen celular entre fases es proporcional y las células presentan crecimiento alométrico.

6.- La discriminación cualitativa entre tratamientos, entendiendo por tales las observaciones en vivo o tras la utilización de impregnaciones, para la obtención de criterios de mayor o menor efectividad de éstas en la identificación o diferenciación morfométrica de los clones estudiados.

7.- El estudio biométrico de todos los clones estudiados, por medio de un estudio estadístico de análisis multivariante. Con este fin se utilizan variables morfométricas consideradas en algunos estudios morfológicos previos. Los resultados se pueden entonces comparar con los obtenidos anteriormente por medio de las técnicas de identificación utilizadas normalmente en los estudios clásicos de este género, como se indicó en los primeros objetivos de este trabajo.

8.- La utilización de técnicas moleculares, en concreto, la utilización de una sonda molecular específica, como otro medio de identificación de especies. Esta aproximación permite la comparación con los otros puntos indicados en el presente trabajo, esto es, la identificación clásica de los clones, los parámetros trofodinámicos obtenidos sobre estos y la identificación morfométrica por medio de análisis multivariante.

2. ANTECEDENTES

2.1. El estudio del género Uronema

El estudio de la clasificación del género Uronema se remonta a mediados del siglo pasado, con la primera descripción del género y la especie tipo: Uronema marina Dujardin, 1841. Desde entonces múltiples descripciones han sido incluidas en este género, descripciones que han ido delimitando cada vez más la definición del género. Las descripciones durante todo este tiempo se pueden clasificar en dos grupos: las descripciones antes y después de la aplicación de impregnaciones argénticas, como asimismo ocurre para el resto de los taxones en ciliados.

La aplicación de las impregnaciones revolucionó el estudio taxonómico en ciliados, poniendo en evidencia el considerable número de detalles en sus superficies con respecto a patrones de ciliación, cinetosomas, estructuras fibrilares y procesos morfogénéticos, que hoy en día son utilizados tanto en la caracterización taxonómica como filogenética. En el caso de Uronema, como en el del resto de los ciliados, este paso delimitó mucho más claramente las características del género, basándose principalmente en caracteres de composición estructural del área bucal y somática, y prácticamente redujo de manera drástica el número de especies citadas. El trabajo de Parducz (Párducz, B., 1939), primer trabajo que utiliza una técnica de impregnación en el estudio morfológico de una de las especies de este género, marca el comienzo del segundo grupo de descripciones indicado en el párrafo anterior.

El estudio sistemático de muchas especies, desafortunadamente, en el grupo de los protistas todavía presenta problemas y la habilidad para reconocer especies, tanto en el caso de Uronema como en el de otros ciliados, ha quedado limitada precisamente por la variabilidad morfológica encontrada en algunas de sus especies y por confusiones en la delimitación de éstas por medio de

impregnaciones argénticas. Las confusiones entre algunas especies, que se remontan a principios de siglo, como por ejemplo en los casos de U. marinum o U. nigricans, no han sido aun resueltas, y en este ejemplo concreto la delimitación estas especies sigue siendo muy confusa. Mientras algunos autores consideran éstas claramente distintas (Agamaliev, F.G., 1978; Dragesco, J. y Dragesco-Kerneis, A., 1991; Puytorac, P.d. y col., 1974; Song, W.B., 1991; Thompson, J.C. y Evans, F.R., 1968; Wilbert, N. y Kahan, D., 1981), otros consideran U. nigricans un sinónimo de U. marinum (Téllez, C., 1980).

La interpretación de resultados experimentales y de observaciones sobre estas especies podría, sin embargo, llegar a ser imprecisa y posiblemente irreproducible sin una identificación fiable de los organismos. El caso de la variabilidad morfológica del género Uronema ha sido anotado múltiples veces (J. Dragesco y A. Dragesco-Kerneis, 1991; C. Téllez, 1980; J.C. Thompson, 1972), lo que ha dado lugar a la creación algunas veces de nuevas especies de dudosa aceptación (Fernández-Leborans, G. y Zaldumbide, M.C.d., 1984; Foissner, W., 1971; Stein, B.H. y Hamilton, R.D., 1969). Pero se ha de puntualizar aquí que una de las causas que ha contribuido a estas confusiones, ha sido precisamente la utilización de diferentes impregnaciones en las descripciones aparecidas en distintos trabajos.

2.2. Morfología clásica: historia de Uronema.

La primera descripción del género Uronema es de Dujardin (1841) que incluyó este género junto con otros cuatro, dentro de la familia que denominó como "Enchélyens" perteneciente al cuarto orden de su clasificación.

El género quedó definido con la inclusión de la especie tipo Uronema marina, especie aislada en el Mar

Mediterráneo, "con cuerpo incoloro, semitransparente, nodulado y alargado, ligeramente curvado hacia delante y con cuatro o cinco cinetias ("côtes longitudinales") en cada lado de la célula, de 44 μ m longitud, con una vacuola en la extremidad posterior, así como un largo filamento en el extremo posterior". Uno de los caracteres definitorios utilizados por Dujardin en la creación de este género fue la carencia de área bucal.

Desde la creación por Dujardin del género Uronema numerosos estudios posteriores incluyeron nuevas especies, modificando paulatinamente la definición de éste con mejores descripciones. Así, la segunda mención de esta especie 25 años más tarde aparece con el trabajo de Cohn (1866) (Cohn, F., 1866), donde se publica la descripción de una especie identificada con la descrita por primera vez por Dujardin. Cohn, llega a un mayor detalle morfológico describiendo la presencia de un área bucal en la parte central de la cara ventral. Este autor denomina dicha especie Uronema marinum Dujardin, 1841, denominación que ya no coincide con la original y que actualmente es la que se usa para el género.

Kent en su "Manual of the Infusoria" (Kent, W.S., 1882) describe el género Uronema y una especie que identifica con U. marinum Dujardin, 1841. Sorprendentemente, este autor al igual que Cohn vuelve a denominar dicha especie como U. marinum y no U. marina que en realidad es la denominación de la descripción original con la que se identifica, aunque en el dibujo asignado a dicha descripción la denomina U. marina Dujardin.

El género Criptochilum creado por Maupas en 1883 (Maupas, E., 1883) incluye, además de otras especies, la especie Cryptochillum nigricans que posteriormente será considerada por otros autores como una sinonimia de Uronema marina Dujardin, 1841. Maupas considera que la especie

Cyclidium nigricans O.F. Müller 1786 es una sinonimia de su nueva especie Cryptochilum nigricans. La descripción de esta especie es bastante buena, así como sus dibujos de la célula en vivo, que son fácilmente identificables con la concepción actual del género Uronema. La única mención que este autor realiza con respecto a Uronema marina Dujardin, 1841, es para considerarla como una sinonimia de Anophrys de Cohn (F. Cohn, 1866).

Fabre-Domerge (1885) (Fabre-Domerge, P.L., 1885) crea un nuevo género ectoparásito de Asteria, el género Philaster. La especie tipo Philaster digitiformis de cuerpo muy flexible y elástico, pero no contráctil, cilíndrico y redondeado en la parte posterior y disminuyendo hacia la parte anterior con un tamaño entre 90 y 110 μm . Este caso probablemente no se trate de ningún ciliado perteneciente al género Uronema, ya que las células en estas especies no son ni flexibles ni elásticas, sin embargo fue considerado posteriormente por Bütschli (Bütschli, O., 1889) y por Cuénot (Cuénot, L., 1891), como se verá más adelante, una sinonimia del género Uronema Dujardin, 1841.

Bütschli en su publicación entre 1887-9 (O. Bütschli, 1889) cita también el género Uronema Dujardin, 1841 cuya descripción identifica con la de Cohn (1866). Este autor apunta, asimismo, que Enchelys triqueta Dujardin 1841, Cryptochilum Maupas 1883, Philaster Fabre-Domerge 1885, Urotrica p.p. Dies y Saprophilus Stokes 1888, son sinonimias de la especie y el género respectivamente, descritos por Dujardin, considerando que la identificación de Maupas entre la especie U. marina Dujardin 1841 y de Anophrys de Cohn no fue correcta (E. Maupas, 1883). Este autor identifica U. marina Dujardin 1841 con Cryptochilum nigricans Maupas, 1883, y aunque no hace referencia en el texto a esta sinonimia entre especies, sí la indica en las figuras, las cuales fueron copiadas del trabajo de Maupas, como el mismo autor indica.

Bütschli incluye por tanto en el género Uronema tres especies U. marina (syn. Cryptochilum nigricans Maupas), U. griseola (syn. Cryptochilum griseolum Maupas) y U. torta (syn. Cryptochilum tortum Maupas). Este autor sin embargo, no indica si considera que Cryptochilum elegans Maupas, 1883, debería ser transferido al género Uronema, sin embargo establece como dudosa la inclusión de Cryptochilum echini en dicho género. Así se van definiendo cada vez más los caracteres del género, con la inclusión poco a poco de nuevas especies en éste.

La primera observación publicada sobre miembros del género Uronema en agua dulce es de Stokes (1888) (Stokes, A.C., 1888). La clasificación seguida por Stokes es la utilizada por Bütschli. La especie identificada por éste es denominada como la descrita por Dujardin Uronema marina.

Gourret y Roeser en 1888 (Gourret, P. y Roeser, P., 1888) publican descripciones de varias especies en un estudio sobre ciliados tanto marinos como dulceacuícolas en Córcega. Estos autores no citan Uronema, sin embargo sí describen dos especies, Cryptochillum nigricans Maupas, 1883 y Cryptochillum griseolum Maupas, 1883, que serán posteriormente incluidas en el género Uronema. El dibujo mostrado de Cryptochillum nigricans Maupas 1883 en este trabajo, es de dos células en conjugación y parece probablemente la misma especie que Maupas observó. Sin embargo, la especie descrita por estos autores como Cryptochillum griseolum Maupas 1883 variedad marina, no parece encajar con la especie descrita por Maupas bajo dicha especie. La especie Cryptochillum fusiforme es descrita en este trabajo por primera vez.

Cuénot (1891) (L. Cuenot, 1891) describiendo especies de protozoos parásitos y comensales de equinodermos, incluye dos dentro del género Uronema: Uronema echini (Syn. Cryptochilum echini Maupas, 1883), que no fue incluida por

Bütschli en dicho género al considerarla dudosa (O. Bütschli, 1889) y Uronema digitiformis (Syn. Philaster digitiformis Fabre-Domerge, 1885), esta última considerando la publicación anterior de Bütschli (O. Bütschli, 1889) en la que dicho autor incluyó dicho género como una sinonimia de Uronema Dujardin 1841, afirmación con la que este autor se identificó completamente. Se ha de precisar aquí, sin embargo, que la especie descrita por Fabre-Domerge en 1885, no coincide con los caracteres hasta entonces utilizados para identificar el género Uronema Dujardin 1841, lo cual se puede observar por la descripción y los dibujos mostrados por dicho autor. Es sorprendente que tanto Bütschli (O. Bütschli, 1889) como Cuénot (L. Cuenot, 1891) considerasen que dicha especie debería ser incluida en el género Uronema. Sin embargo, debemos tener en cuenta que todavía aquí los caracteres definitorios de este género estaban basados en las observaciones en vivo.

La especie U. marina Dujardin 1841, es citada de nuevo por Schewiakoff (Schewiakoff, W., 1893) estudiando protozoos de agua dulce. Este autor describe una especie muy pequeña aislada de una muestra del Niágara (20-30 x 13 μ m) que identifica con U. marina Dujardin 1841. Esta observación no añade nada nuevo a la definición de la especie o el género, pero es la segunda vez que se identifica una especie de agua dulce como U. marina Dujardin, 1841. Este autor describe además una nueva especie que denomina Uronema ovale, sin embargo, dicha especie parece ser muy grande (90x40 μ m) y por el dibujo mostrado, la forma celular, el área bucal y su situación, esta especie no parece corresponderse con la descripción ni entonces, ni actual del género Uronema.

La especie U. marina Dujardin, vuelve a ser citada de nuevo en 1901 por Florentin en un trabajo sobre los lagos salados de Lorraine (Florentin, R., 1901). Este autor identifica U. marina Dujardin, 1841 con U. nigricans O.F.

Müller, 1786, aceptando el trabajo de Bütschli publicado dos años antes (O. Bütschli, 1889). Sin embargo, parece que este autor es la autoridad considerada como la que indicó claramente la identidad de ambas especies, al indicar que U. marina se puede aclimatar a medios salados, como los encontrados en dichos lagos, como a dulceacuícolas.

El siguiente trabajo en el que se vuelve a citar alguna especie de Uronema no aparece hasta nueve años más tarde con el trabajo de Martini (Martini, E., 1910). En éste se cita a una especie que aparece en una infección intestinal, creando una nueva especie para la descripción de esta Uronema caudatum Martini, 1910. Martini consideró que dicha especie era patógena. Esta especie será posteriormente considerada por Hoare como perteneciente al género Cyclidium (Hoare, C.A., 1927).

Nuevas descripciones dentro de este género de especies marinas aparecen con Buddenbrock (Buddenbrock, W.v., 1920). Éste encuentra un organismo que es similar a la especie Cryptochilum nigricans Maupas 1883 (E. Maupas, 1883), descripción que él considera una sinonimia de la especie U. marina Quennerstedt y U. marina Schewiakoff, 1893 a la que denomina U. schewiakoffi en honor a dicho protozoólogo. Buddenbrock acepta por tanto la identidad de los géneros Uronema Dujardin, 1841 con Cryptochilum Maupas, 1883 propuesta por Bütschli pero no acepta o no tiene en cuenta la sinonimia entre las especies U. marina Dujardin, 1841 y Cryptochilum nigricans Maupas, 1883, que dicho autor propuso en ese mismo trabajo (O. Bütschli, 1889), estableciendo por lo tanto una nueva combinación. Además de la nueva combinación, una nueva especie es descrita en este trabajo dentro del género Uronema que Buddenbrock denomina U. acutum, cuya descripción en vivo se corresponde bastante bien con nuestras observaciones sobre el clon P. acutum (clon CCAP) considerado en este estudio.

Penard en 1922, incluye en el género Uronema seis nuevas especies que denomina U. gemmuliferum, U. biceps, U. dubium, U. microcrepis, U. simplex, y U. sociale (Penard, E., 1922). Por las descripciones y los dibujos realizados por dicho autor, dichas especies no parecen ajustarse a la concepción que se tenía hasta entonces sobre el género Uronema, lo cual será posteriormente reflejado en las nuevas combinaciones que Kahl realizó sobre estas descripciones (Kahl, A., 1931).

Considerando las descripciones de Martini (E. Martini, 1910), Yakimov (Yakimov, V., 1922) y Yakimov y Kolpakova (Yakimov, V. y Kolpakova, T., 1922), presentan de nuevo citas de una especie que identifican con Uronema caudatum Martini 1910, que aparece en heces de enfermos con disentería. Esta especie siempre se encontró asociada con otros organismos. Aunque Martini consideró que esta especie era patógena en el hombre, estos autores fueron incapaces de asegurar tal extremo. La especie que estos autores citan como similar a la de Martini, es sin embargo posteriormente considerada diferente de aquella por Hoare (C.A. Hoare, 1927) que identifica esta descripción con la especie Lembus pusillus, quedando excluida como la especie observada por Martini (E. Martini, 1910) del género Uronema.

El estudio llevado a cabo por Kahl (Kahl, A., 1926) incluye dos nuevas especies en el género Uronema. Una que denomina Uronema acuminata Kahl, 1926, a la cual es incapaz de identificar con ninguna de las especies descritas hasta aquel momento dentro del género Uronema, aunque los caracteres descritos por este autor parecen recordar bastante a la especie descrita por Buddenbrock como U. acutum (W.v. Buddenbrock, 1920).

La otra nueva especie es U. kenti creada para incluir a la especie descrita por Kent como U. marinum (W.S. Kent, 1882), especie que Kahl considera que no coincide con la

descripción mantenida para Uronema marina Dujardin, 1841. Kahl en este caso hace notar la discrepancia del nombre específico utilizado por Kent, y propone que el nombre debe continuar como U. marina, decantándose por la identificación establecida por Bütschli (O. Butschli, 1889) y considerando aceptable asimismo la sinonimia establecida por éste con Cryptochilum nigricans Maupas, 1883. Sin embargo, Kahl considera que la especie descrita por Schewiakoff (W. Schewiakoff, 1893) bajo el nombre de U. marina en realidad no se atiene a las características típicas de dicha especie, aunque se abstiene de dar ninguna otra opinión reconociendo no haber encontrado ningún espécimen parecido a dicha descripción, pero denomina a dicha especie con un nombre distinto: U. schewiakowii aunque sin ninguna descripción.

Kahl presenta, asimismo, descripciones de Uronema biceps Penard 1922 y Uronema socialis Penard 1922, especies que mantiene en el mismo género en el que fueron incluidas por Penard, a pesar de las diferencias encontradas con las características consideradas en dicho género hasta entonces. Sin embargo, Kahl no considera que Uronema microcrepis Penard, 1922 presenta las características del género y la incluye como una sinonimia de la especie Loxocephalus centralis Stokes. Otra especie es descrita por Kahl en este trabajo por primera vez: Uronema solivaga. Ésta tampoco presenta las características típicas consideradas en el género Uronema. En realidad esta especie, tiene cierto parecido con algunas de las descritas por Penard (E. Penard, 1922) en el género Uronema, ésta sea probablemente la razón por la que Kahl describe esta especie bajo este género, aunque la traslada a un nuevo género en un trabajo posterior.

La primera descripción de U. nigricans como tal aparece en 1926 (Lepsi, J., 1926). Este autor considera que la especie descrita por Maupas como Cryptochilum nigricans

(E. Maupas, 1883), que seguía siendo considerada hasta ahora una sinonimia de U. marina Dujardin, 1883, presentaba características lo suficientemente distintas de dicha descripción como para presentar identidad propia, y propone como nueva combinación U. nigricans Maupas, 1883. Este autor presenta otras dos descripciones en el género Uronema, una de Uronema sp. y otra de una nueva especie denominada Uronema opisthostoma. Parece que éste llega a una conclusión a la que otros autores llegaron anteriormente (O. Butschli, 1889; R. Florentin, 1901).

El estudio llevado a cabo por Hoare en 1927 (C.A. Hoare, 1927) sobre especies coprozoicas, entre las que incluye al género Uronema, identifica y describe una especie como U. nigricans a la que considera una sinonimia de U. marina Dujardin, 1841 y Chrytochilum nigricans Maupas, 1883. Hoare considera que la distinción que entre ambas especies se había mantenido durante tanto tiempo, parece que fue debida a discusiones sobre los hábitats típicos de ambas, siendo considerada U. marina como especie presente tanto en aguas dulces como marinas, mientras que Cryptochilum nigricans fue únicamente especie marina. Hoare considera sin embargo, que esta distinción es errónea y que ambas descripciones corresponden a ciliados ambos presentes, tanto en medios marinos como de agua dulce, que difieren en ciertas proporciones de longitud, anchura y posiciones del núcleo y por lo tanto que U. marina Dujardin, 1841 se corresponde con Cryptochilum nigricans Maupas, 1883 y debe ser denominada Uronema nigricans (O.F. Müller, 1786) Florentin, 1901. Fue Florentin el primer autor en señalar dicho cambio y siendo ésta especie la especie tipo del género Uronema. Las descripciones llevadas a cabo por Hoare se basaron en dos organismos, uno de origen marino y otro de agua dulce, que él consideró constituían la misma especie U. nigricans. Para demostrar este punto realizó diferentes experimentos de aclimatación tanto del organismo de agua dulce, como el marino a medios distintos de los que

procedían. Extremo que demostró observando que la morfología de los ciliados sufrió modificaciones durante dichos tratamientos, adquiriendo los caracteres típicos del organismo encontrado en dicho medio originalmente.

Hoare crea, asimismo, el género Pseudouronema para incluir la descripciones realizadas por Schewiakoff de Uronema (U.marina y U. ovale), descripciones que ya habían sido apuntadas como diferentes de U. marina Dujardin, 1841 por otros autores (Buddenbrock 1920 U. schewiakoffi o Kahl 1926 U.schewiakowii)

Kahl (A. Kahl, 1931) realiza una redescrición del género Uronema, reorganizando muchas de las especies anteriormente incluidas en éste y preparando una clave de identificación para éstas.

La especie descrita como Cryptochilum nigricans por Maupas, 1883 es identificada por Kahl con U. marinum, por lo tanto este autor concluye con la identificación de ambos géneros. Se refiere entonces a la especie Cyclidium nigricans O.F. Müller, 1786 como la especie que debería ser considerada especie tipo del género Uronema, aunque reconoce que la forma descrita por dicho autor es indeterminable y que por lo tanto la forma descrita por Dujardin deberá ser la que permanezca como especie tipo en este género. Kahl, sin embargo, denomina dicha especie como U. marinum, cuando la descripción de Dujardin fue denominada U. marina, sin embargo esto lo indica en la descripción.

Tras describir brevemente las preferencias tanto marinas como de agua dulce de este género, produce una clave en la que define el género Uronema, y en esta a la especie tipo U. marinum como formas delgadas u ovoides, con el extremo anterior truncado, y la superficie celular cubierta de cilios (12 cinetias). El área bucal situada

ventralmente hacia el margen derecho, en una ligera depresión a nivel medio en la célula, sin llegar a ser reniforme. La absorción de alimento se produce en posición estática. Describe asimismo, la ausencia de hebras mucilaginosas con las que fijarse al substrato, característica que pertenece a la nueva especie descrita por él como Uronema filificum. Esta se diferencia de U.marinum por su forma celular delgada lateralmente, que presenta una gran placa anterior, y con la forma celular que se estrecha posteriormente en forma de huso. Esta especie presentaba aproximadamente dieciséis cinetias.

Kahl describe también en el género Uronema las especies U. acutum v. Buddenbrock, 1920, U. elegans (syn. Cryptochilum elegans Maupas, 1883), U. tortum (syn. Cryptochilum tortum Maupas, 1883), U. schewiakoffi (syn. U. marina Schewiakoff, 1889), U. granulatum Lepsi, 1926 y U. rabaudi Cépède, 1910.

En el caso de U. acutum v. Buddenbrock, 1920 describe la típica forma acuminada anterior de este ciliado, y la característica típica también de no presentarse nunca en reposo. U. elegans (syn. Cryptochilum elegans Maupas, 1883) es descrita como una forma más oval que las otras y con forma arriñonada. U. tortum (syn. Cryptochilum tortum Maupas, 1883) es descrita como presentando la mitad posterior celular retorcida, de ahí la denominación de dicha especie.

El resto de las especies arriba citadas son consideradas en un grupo aparte de especies que incluye bajo el epígrafe de formas de de agua dulce de dudosa acepción y endoparásitos marinos. Se ha de hacer constar que la descripción de U. schewiakoffi (syn. U. marina Schewiakoff, 1889), incluida en este grupo, corresponde a la que Kahl denominó en su trabajo de 1926 como U. schewiakowii, ignorando entonces el trabajo anterior de

Buddenbrock en 1920, en que se incluyó la especie descrita como U. marina por Schewiakoff en esta nueva combinación. Kahl parece, sin embargo, ignorar el trabajo de Hoare (C.A. Hoare, 1927) en el que creo el nuevo género Pseuduronema para incluir las especies descritas por Schewiakoff (W. Schewiakoff, 1893).

En este trabajo Kahl considera, asimismo, que las especies Uronema biceps Penard 1922, Uronema socialis Penard 1922 que en su trabajo de 1926 citó como pertenecientes al género Uronema, deben ser incluidas en un género distinto al que denomina Balanonema, esta decisión no es sorprendente ya que como indicamos anteriormente dichas descripciones no se ajustaban a la descripción de Uronema considerada hasta entonces.

Madsen en 1931 (Madsen, H., 1931) presenta otra descripción de U. marinum de origen marino. Este autor reconoce que esta especie es idéntica a Cyclidium nigricans O.F. Müller, 1786 indicando que acepta esta opinión como hiciera antes Kahl, 1931. Describe asimismo este autor otra especie que identifica con Uronema acutum Buddenbrock, 1920 (W.v. Buddenbrock, 1920).

Las últimas publicaciones en las que se describen especies en el género Uronema, sin el intermedio de alguna técnica de impregnación, se corresponden a las de Uronema pluricaudatum (Noland, L.E., 1937), Uronema botuliformis (Wenzel, F., 1961) y Uronema constanziana (Tucolesco, J., 1962).

Como se puede observar hasta este punto el género Uronema había quedado estabilizado en las principales descripciones y cambios llevados a cabo por Kahl (A. Kahl, 1931), con la última adición de las especies incluidas en el último párrafo, de las cuales únicamente la última (U. constanziana) a pesar de lo escueto de la descripción

presentada, parece corresponderse realmente con alguna de las características para ser incluida dentro del género Uronema.

2.3. Morfología clásica: la llegada de las impregnaciones.

El comienzo de la utilización de impregnaciones para el estudio morfológico de ciliados, y en concreto el caso de Uronema, aparece con el estudio llevado a cabo por Parducz en 1939 con la técnica de Klein, sobre una especie que identifica con U. marinum Dujardin, 1841. Desde entonces hasta hoy en día se han descrito o redescrito por medio de impregnaciones en este género nueve especies, siendo la impregnación mayormente utilizada la de nitrato de plata o técnica de Chatton-Lwoff.

Por tanto, el desarrollo de las impregnaciones y su aplicación, han dado lugar al establecimiento de colecciones de especímenes-tipo, concepto que es relativamente nuevo en taxonomía de estos organismos, ya que previamente las únicas fuentes de especímenes tipo, fueron en realidad las descripciones originales, que carecían de detalles suficientes para la correcta identificación. En el caso del género Uronema se han llevado a cabo redescriptiones de casi todas las especies por medio de la impregnación de nitrato de plata o técnica de Chatton-Lwoff (Czapik, A., 1968; Thompson, J.C., 1964; J.C. Thompson y F.R. Evans, 1968; Thompson, J.C. y Kaneshiro, E.S., 1968) de las cuales se mantienen holotipo y paratipos depositados en una colección internacional¹.

Todas las especies incluidas en el género Uronema originalmente descrito por Dujardin en 1841 (Dujardin, F., 1841), actualmente quedan incluidas en la familia

¹ International Collection for Ciliate Type Specimens (Museum of Natural History of the University of Illinois)

Uronematidae Thompson 1964, suborden Philasterina
Small, 1967 y Orden Scuticociliatida Small, 1967 (Levine,
N.D. y col., 1980).

Orden Scuticociliatida Small, 1967

Suborden Philasterina Small, 1967

Familia Uronematidae Thompson 1964

Género Uronema Dujardin 1841

Uronema marinum Dujardin, 1841

Uronema nigricans (O.F. Müller, 1786) Florentin, 1901

Uronema acutum von Buddenbrock, 1920

Uronema elegans (Maupas, 1883) Kahl, 1931

Uronema filificum Kahl, 1931

Uronema pelagica Stein & Hamilton, 1969

Uronema parduczi Foissner, 1971

Uronema muscicola Téllez, 1980

Uronema castellonensis Fernández-Leborans & Castro
Zaldumbide, 1984

Las especies, que más se han estudiado se refieren,
por orden, a U. marinum, U. nigricans, U. acutum, U. elegans y U. filificum, siendo el resto casos de una única
cita. En todas estas especies, sin embargo, únicamente las
descripciones referentes a Uronema acutum, parecen tener
normalmente regularidad de caracteres, mientras que las
otras cuatro presentan cierta variabilidad en las
descripciones.

Diversas discusiones han considerado Uronema
nigricans, Uronema parduczi y U. castellonensis como
sinónimos de U. marinum, justificándose la existencia de
una gran variabilidad morfológica dentro de esta especie,
aunque realmente nunca se han definido claramente los
límites de ésta. Esta gran variabilidad hace de ella el
sujeto ideal para un estudio más profundo, considerando el
aislamiento de más de un organismo y utilizando más de una
técnica de impregnación, ya que por ejemplo la impregnación

mayormente utilizada - nitrato de plata - no presenta la resolución suficiente para la identificación de cinetosomas individuales en las células tan pequeñas de las especies de Uronema. La utilización de otras técnicas (carbonato de plata o protargol) aunque empleadas en algunos trabajos (Small, E.B. y Lynn, H.D., 1985; C. Téllez, 1980), no se han llevado a cabo conjuntamente, lo que en cierta manera ha reducido la posibilidad de las comparaciones de las observaciones de unas impregnaciones con las otras sobre exactamente los mismos organismos.

Las impregnaciones y la carencia de estudios comparativos por medio de las distintas técnicas, ha dado lugar a descripciones y redescripciones del mismo organismo, y en casos extremos a identificaciones de organismos como distintos, cuando en realidad, las únicas diferencias encontradas, yacían en la utilización de una técnica de impregnación distinta.

Los caracteres comunes que han mantenido a todas estas especies en el género Uronema han quedado definidos gracias a la utilización de impregnaciones. Estos caracteres han sido, la característica composición del área bucal por tres policinetias más una haplocinetia. La policinetia 1 o M1 constituida por una única línea de cinetosomas no ciliados, la policinetia 2 o M2, compuesta en general por tres líneas de cinetosomas ciliados, y la policinetia 3 o M3, ciliada, de forma irregular y de composición variable. La haplocinetia compuesta por dos líneas de cinetosomas de las cuales sólo la externa es ciliada, y con una típica forma de signo de interrogación. Estos caracteres fueron modificados ligeramente (E.B. Small y H.D. Lynn, 1985) en lo que a la situación del citostoma se refiere, que según dichos autores queda a nivel ecuatorial de la célula o sobre él.

Estos caracteres son comunes a todas las especies

indicadas, excepto en el caso de U. acutum. Como se verá más adelante, esta especie, a pesar de que muchos autores todavía la consideran dentro del género Uronema, los caracteres de sus estructuras bucales, principalmente en lo concerniente a la polícinetia 1 (que presenta dos líneas y es ciliada), no parecen quedar cerca de las características descritas para las especies de Uronema.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MEDIOS DE CULTIVO

El material utilizado para el cultivo, mantenimiento y experimentación con los ciliados marinos, así como la manipulación del agua de mar, y preparación de medios fue de policarbonato Nalgene® o de plástico de poliestireno rígido esterilizable en autoclave. Para los ciliados de agua dulce y la manipulación de agua mineral se utilizó indistintamente material de cristal Pyrex.

3.1.1. Agua de mar

El agua de mar utilizada durante todo este trabajo fue amablemente cedida por el Zoológico de Londres (Regents Park). Dicha Institución recoge agua de mar del Golfo de Vizcaya, para el mantenimiento de su acuario, con una salinidad entre 33-35 ‰.

El agua de mar fue recogida en contenedores de polietileno rígido de 25 litros. Una vez en el laboratorio, se filtró a través de filtros tipo GF/C (Whatman) para eliminar material particulado. Posteriormente se mantuvo un mínimo de un mes en cámara fría (10° C) y en completa oscuridad en contenedores limpios de 50 y 25 litros de plástico de polietileno rígidos.

El agua así "envejecida" fue de nuevo filtrada antes de utilizarse, a través de un filtro tipo GF/F (Whatman) y un filtro de membrana de policarbonato de 0.2 μm de tamaño de poro y después esterilizada en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Cuando en los protocolos descritos en este apartado se hable de agua de mar, deberá entenderse agua de mar filtrada y esterilizada por el proceso aquí mencionado.

3.1.2. Agua mineral

El agua utilizada para el mantenimiento, y los procesos experimentales realizados con los ciliados de agua dulce fue el agua mineral conocida con el nombre de "Volvic". Esta fue esterilizada en autoclave antes de su utilización durante 15 minutos a 121°C.

3.1.3. Medios de cultivo bacterianos

FWNA-Agar nutritivo

Este medio se utilizó de ordinario para el aislamiento y mantenimiento de bacterias procedentes de las muestras de agua dulce. El medio fue preparado con agar nutritivo Oxoid (CM3) siguiendo las instrucciones del fabricante. La esterilización se llevó a cabo a 121°C durante 15 minutos. (Anexo 1)

SW/PYE-Agar Peptona-Extracto de levadura-agua de mar

El medio SW/PYE se empleó para el mantenimiento y aislamiento de bacterias de las muestras marinas. La composición de dicho medio fue la siguiente:

Proteasa peptona (Oxoid L85)	5 g
Extracto de levadura (Oxoid L21)	2 g
Agar (Oxoid no.3)	15 g
Agua de mar	1 L

La esterilización se llevó a cabo en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Caldo nutritivo

Este medio se utilizó para el cultivo de bacterias de

agua dulce en medio líquido. El caldo nutritivo utilizado fue de Oxoid (CM1), preparado según las instrucciones del fabricante y esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos. (Anexo 1)

Caldo Peptona-Extracto de levadura-agua de mar

Este fue el medio líquido utilizado en el caso de bacterias marinas. La composición del medio fue la siguiente:

Proteasa peptona (Oxoid L85)	5 g
Extracto de levadura (Oxoid L21)	2 g
Agua de mar	1 L

Esterilización en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

3.1.4. Medios de cultivo de ciliados

Los ciliados fueron mantenidos en cultivo monoxénico con bacterias. Dichos medios fueron preparados con agua de mar (SW/bacteria) o Volvic (FW/bacteria) más una suspensión de bacterias.

Estos se prepararon en el momento de su utilización, de la siguiente manera: las bacterias cultivadas en agar nutritivo fueron recogidas con una asa de siembra y se suspendieron en un tubo de vidrio universal (30 ml) con 15 ml de agua de mar o volvic estériles. Dicha suspensión (que presentaba una concentración de bacterias muy alta, normalmente del orden de 10^{11} bacterias/ml) una vez diluida adecuadamente, constituyó el medio utilizado para el aislamiento, mantenimiento y experimentación con los escuticociliados.

Las bacterias utilizadas fueron tanto estirpes marinas como de agua dulce, dependiendo de la especie a estudiar y de ellas hablaremos en el siguiente apartado.

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

3.2.1. Muestras

Las muestras fueron tomadas en tubos universales desechables de 30 ml de capacidad estériles (Sterilin®). Una vez en el laboratorio cada muestra fue homogeneizada y dividida en tres submuestras que se colocaron en sendas placas de Petri desechables (50 mm de diámetro) de poliestireno estériles. Dos de las placas fueron enriquecidas con medio grano de trigo estéril, o con Cerophyl estéril. Las muestras así preparadas se observaron todos los días durante dos semanas, hasta que se detectó la aparición de escuticociliados.

Al mismo tiempo, del tubo original fue tomada una muestra para el aislamiento de bacterias. Dicho aislamiento se llevó a cabo en el medio FWNA, para las muestras de agua dulce y en medio SW/PYE para el caso de las muestras marinas.

3.2.2. Bacterias

Las bacterias utilizadas en este estudio como medio base para el cultivo monoxénico de los escuticociliados, fueron en principio tanto estirpes obtenidas de colecciones de cultivo como aisladas directamente de las muestras de donde provenían los ciliados.

El proceso de aislamiento fue llevado a cabo por agotamiento en dos placas de agar nutritivo (FWNA o SW/PYE)

a 25°C y 18°C. En los casos en que aparecieron colonias aisladas, éstas se mantuvieron en la colección de cultivo en caldo y agar nutritivo. Estas estirpes fueron utilizadas para el aislamiento de escuticociliados de las muestras de las que procedían. Aunque se aislaron muchas estirpes, sólo una de ellas, la estirpe denominada RBM-1, se utilizó ampliamente en este estudio.

La colección de bacterias fue mantenida a 25°C y 18°C tanto en agar como en caldo nutritivo, así como en nitrógeno líquido. El proceso llevado a cabo en este caso fue el descrito para mantenimiento de estirpes en la ATCC (American Type Culture Collection).

Las estirpes bacterianas procedentes de colección de cultivo fueron las siguientes:

Vibrio natriegens NCIMB#857¹

Enterobacter aerogenes (#1808 - Surrey University)

3.2.3. Ciliados

Los protozoos escuticociliados utilizados fueron aislados tanto de muestras marinas (en columna de agua o en sedimento del área intermareal) como de agua dulce. Una vez que los escuticociliados fueron detectados, se comenzó el proceso de aislamiento y la obtención de cultivos clónicos. En este proceso, los escuticociliados fueron seleccionados con la ayuda de una micropipeta estéril, y después lavados uno a uno hasta seis veces en sendas gotas de agua mineral o agua de mar sobre un porta estéril de 76 x 51 mm.

Cada ciliado, una vez lavado, fue colocado en uno de los pocillos de una placa estéril de poliestireno, donde

¹ National Collection of Industrial and Marine Bacteria.
Aberdeen.

previamente se había colocado 1.5 ml de agua de mar o de volvic estéril, más una gota del stock de bacterias en suspensión. Dichas placas de cultivo, constan de 25 pocillos de 100 x 100 mm (placas Cel-Cult Sterilin®, de fondo plano), así que cada proceso para la obtención de clones se llevó a cabo con 25 ejemplares de cada ciliado en proceso de aislamiento. Los ciliados aislados fueron mantenidos en cámara de cultivo fría a 18°C y en completa oscuridad. Se observaron las placas todos los días hasta que se comprobó suficiente crecimiento en los pocillos; a continuación se volvía a clonar, de la misma manera, el de mayor crecimiento. Este proceso se repitió para cada uno de los ciliados aislados un mínimo de tres veces.

3.2.3.1. Escuticociliados marinos

La primera parte de este estudio se dedicó principalmente al aislamiento de protozoos escuticociliados de muestras marinas de muy diversa procedencia (Figura 1). Los ciliados denominados **Cil 1**, **Cil 7**, **Cil 3**, **BBCil**, fueron aislados entre los meses de Enero a Julio de 1990 en el laboratorio del Dr. M. Ohman, del Marine Life Research Group en SIO². El resto de los ciliados marinos y de agua dulce fueron aislados en el Departamento de Zoología del Museo de Historia Natural (NHM-Londres) entre los meses de Septiembre 1990 a Diciembre de 1991.

El ciliado **BBCil** fue amablemente cedido por el Dr. D. A. Caron (Woods Hole Oceanographic Institution) al laboratorio del Dr. M. Ohman (Marine Life Research Group) y venía siendo mantenido en cultivo mixto, así que se procedió al proceso de clonaje, como el utilizado en los otros ciliados, siendo clonado tres veces.

Cil 1 fue aislado de una muestra recogida en el muelle

² Scripps Institution of Oceanography. University of California, San Diego. La Jolla. California. EE.UU.

de SIO en Enero de 1990. La muestra fue colocada en pocillos de cultivo celular estériles, algunos de los cuales fueron enriquecidos con un grano de trigo estéril. Las muestras fueron observadas durante toda la semana siguiente a la recolección, hasta que se detectó la aparición de escuticociliados.

Los escuticociliados denominados Cil 7 y Cil 3 fueron aislados de una muestra procedente del acuario "Sea World" (San Diego, EE.UU). Dicha muestra se obtuvo de un tanque de cultivo de rotíferos, que son rutinariamente mantenidos para el alimento de los peces en dicho acuario. La muestra presentaba abundantes poblaciones de escuticociliados e hipotricos, así como de algas unicelulares y rotíferos, por lo que no hubo necesidad de dividir la muestra y enriquecerla. Los ciliados se aislaron directamente de la muestra original y se clonaron como ya se ha explicado anteriormente.

Los ciliados Uronema marinum (CCAP 1986/2), Uronema schewiakoffi (CCAP 1986/1) y Parauronema acutum proceden de la colección de cultivo de la FBA (CCAP)³. Dichos ciliados se consideraron en este estudio, al estar oficialmente identificados, como punto de comparación con los otros clones. Uronema marinum y Uronema schewiakoffi, procedentes de la colección de cultivo en un medio de agua de mar artificial más leche en polvo (Anexo 1), fueron clonados una vez en el laboratorio, con el mismo procedimiento aplicado a los clones aislados "de novo", y después mantenidos en la colección en cultivo monoxénico.

Los datos de la procedencia de estas especies fueron obtenidos de la colección de cultivo (CCAP-FBA). Así, Uronema marinum fue aislada por el Dr. Burkill en la Bahía de Southampton en 1973 (Burkill, P.H., 1978). La especie

³ Culture Collection of Algae and Protozoa. Freshwater Biological Association. Windermere. Inglaterra.

Uronema schewiakoffi fue aislada y donada por el Dr. Parke a CCAP en 1956, y no pudimos conocer ningún otro dato sobre su procedencia. Esta especie ha sido considerada dudosa, a pesar de que oficialmente en la colección de cultivo es denominada como Uronema schewiakoffi, ya que dicha especie fue considerada sinonimia de Uronema marinum por (Hoare, C.A., 1927), y por lo tanto, no existe ninguna cita bibliográfica reciente sobre esta especie.

Parauronema acutum, que se obtuvo en cultivo axénico, fue igualmente clonada y mantenida en cultivo monoxénico con la estirpe *Vibrio natriegens* (NCIMB#857). Esta especie fue originalmente aislada por el Dr. A.T. Soldo y col. en la costa Sur de Florida (EEUU) (Soldo, A.T. y Merlin, E.J., 1972). Después de aislar dicha especie en cultivo axénico, fue identificada por el Dr. A.C. Borrór (comunicación personal) y después enviada a la colección de cultivo (CCAP-FBA).

El resto de los ciliados fueron aislados y clonados en el laboratorio de Protistas del Natural History Museum de Londres y se designaron como clones con las siglas con las que se marcaron los cultivos de procedencia.

El escuticociliado **Ta** fue aislado de una muestra procedente del estuario del Tajo en Lisboa. La salinidad de la muestra fue similar a las muestras marinas (39 ‰) como corresponde a una muestra tomada en superficie en un estuario, por lo que fue considerada como una muestra marina. El medio de aislamiento (SW/bacteria) para su cultivo no fue diluido, sino agua de mar.

El ciliado **X2** fue aislado de una muestra procedente de la playa de Tanjung Kling (Melaka, Malaysia), tomada durante el mes de Agosto de 1990. La salinidad de la muestra resultó ser bastante alta (41 ‰), sin embargo como en los otros casos, se utilizó el agua de mar a salinidad

normal (34 %) durante el proceso de aislamiento.

AD1 y **AD2** fueron aislados de una muestra procedente de la playa de Tsilivi en la isla de Zante (Grecia) recogida en Octubre de 1990.

AE21 y **AE22**, fueron aislados de una muestra procedente de Tallahassee, Florida (EEUU), tomada en Noviembre de 1990.

SWi1 fue aislado de una muestra tomada en frente de la Estación de Biología Marina en Wimereux, Francia, en Marzo de 1991.

3.2.3.2. Escuticociliados dulceacuícolas

Entre los escuticociliados de agua dulce aislados están, **SRBM** y **Scut2.1**. **SRBM** se aisló de una muestra de una planta piloto de tratamiento de aguas residuales de RZM⁴, mantenida en el Natural History Museum de Londres. Este ciliado fue clonado en un medio preparado con la estirpe RBM-1, aislada de la misma muestra. Posteriormente se mantuvo en la colección de cultivo en una suspensión de *Enterobacter aerogenes* y RBM-1.

El escuticociliado **Scut2.1**, se aisló de una muestra del tanque de aireación de la planta de fangos activados de Morden (Londres) en Marzo de 1991. Este ciliado apareció aproximadamente a los cinco días de incubación en una de las muestras enriquecida y fue aislado directamente sobre *Enterobacter aerogenes*, estirpe con la que se mantiene en la colección de cultivo.

⁴ Root Zone Method de Kickuth

3.2.3.3. Colección de cultivo

Los ciliados una vez aislados y clonados, se mantuvieron en colección de cultivo en cámara a 18⁰C, por duplicado, tanto en tubos de ensayo como en tubos universales de polietileno estériles de 30 ml (Sterilin®). La colección se mantuvo única y exclusivamente con el aporte periódico de la suspensión stock de bacterias, realimentando el medio cada dos o tres semanas. La colección se resembró cada cinco o seis meses.

Ciliado	Origen ⁽¹⁾	Fecha ⁽²⁾	S ⁽³⁾
<i>U.marinum</i>	CCAP	?/1976	35
<i>U.schewiakoffi</i>	CCAP	?	35
<i>P.acutum</i>	CCAP	?	35
X2	Melaka (Malasia)	8/1990	41
Ta	Lisboa (Portugal)	9/1990	39
AD1	Isla de Zante (Grecia)	10/1990	
AD2	"	10/1990	
AE2.1	Florida (EE.UU)	11/1990	
AE2.2	Florida (EE.UU)	11/1990	
SWi1	Wimereux (Francia)	3/1991	
Cil 1	SIO (EE.UU)	1/1990	35
BBCIL	SIO "	1/1990	35
Cil 7	S.Diego. "	2/1990	35
Cil 3	S.Diego. "	2/1990	35
SRBM	Londres (Inglaterra)	10/1990	0
Scut 2.1	Londres (Inglaterra)	3/1991	0

Tabla 1.- Escuticociliados marinos y dulceacuícolas

(1).- Procedencia de la muestra original

(2).- Toma de la muestra

(3).- Salinidad de la muestra original (‰)

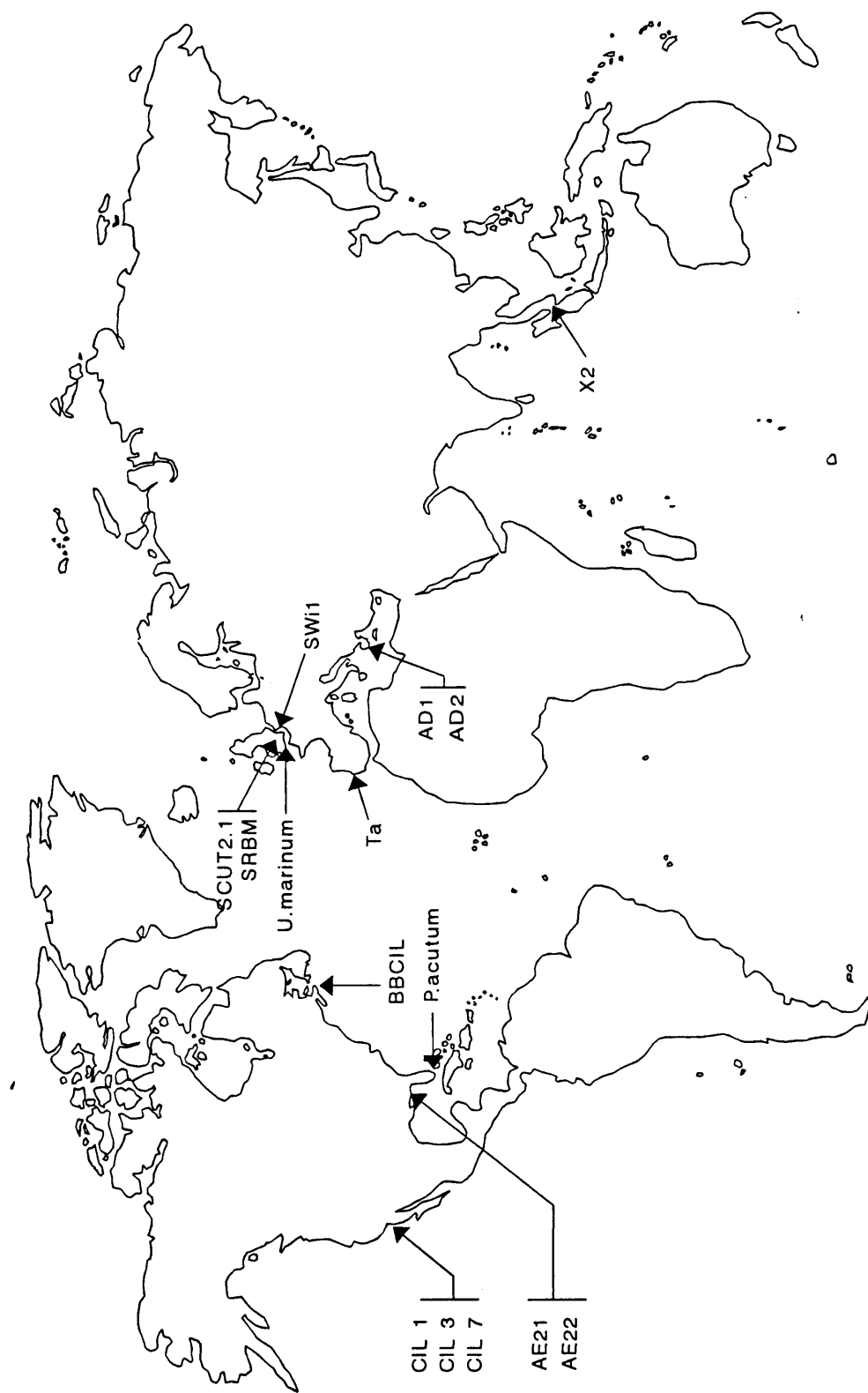


Figura 1.- Distribución geográfica de los clones aislados.

3.3. ESTUDIO TROFODINÁMICO

La determinación de las curvas de crecimiento y los parámetros trofodinámicos de cada ciliado se llevó a cabo en condiciones de cultivo estándar, con la idea de utilizarlos como un criterio más en la diferenciación de los clones.

Los ciliados durante el estudio de las curvas de crecimiento fueron fijados con una solución acidificada de Lugol (Anexo 1) (Steedman, H.F., 1985). Esta solución fue utilizada también para ciliados dulceacuícolas.

3.3.1. Condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo standard utilizadas para los ciliados marinos fueron determinadas en parte por observación empírica sobre el crecimiento de los ciliados, y en parte teniendo en cuenta estudios previos con Uronema en cultivo estático (en batch) (Fenchel, T., 1968; Hamilton, R.D. y Preslan, J.E., 1969; Parker, J.G., 1978; Ohman, M.D. y Snyder, R.A., 1991).

El cultivo estático (en batch) de los escuticociliados se hizo en matraces de Erlenmeyer de 500 y 1000 ml de policarbonato para el caso de los clones marinos o Pyrex para los clones de agua dulce, con 350 ml de agua (de mar o volvic), en incubadora orbital a 18°C y 50 RPM.

En el caso de los ciliados marinos, el cultivo monoxénico se llevo a cabo sobre una suspensión de *Vibrio natriegens* (NCIMB#857), mientras que para los ciliados dulceacuícolas se utilizó la estirpe *Enterobacter aerogenes*. La concentración utilizada de ambas bacterias fue de 10^7 bacterias/mililitro, que se determinó por medio de la curva de calibrado de absorbancias a 600 nm de las

distintas bacterias, que será mencionada posteriormente. Se consideró que esta concentración era adecuada porque los ciliados producían densidades de poblaciones lo suficientemente grandes como para poder llevar a cabo posteriormente tinciones para el estudio morfológico. En el caso de los clones marinos, hay que tener en cuenta que en el medio marino la concentración de bacterias nunca suele superar 10^5 - 10^6 bacterias por mililitro (Rheinheimer, G., 1991) por lo que esta concentración probablemente proporcionaría el máximo crecimiento (mayor número de células) para cada uno de ellos.

Los experimentos se hicieron por triplicado para cada clon y se controlaron durante cinco días. Los muestreos fueron realizados a los tiempos en horas 0, 5, 10, 24, 34, 48, 58, 72, 82, 96 y 106. El volumen de muestra fue de 10 ml fijados con 0.2 ml (2% concentración final de fijador en muestra) de solución acidificada de Lugol (Anexo 1). Los conteos se llevaron a cabo en una cámara de sedimentación de Sedgewick-Rafter (Graticules Ltd.), con un mínimo de cinco réplicas para cada muestra.

El número inicial de ciliados utilizado como inóculo a tiempo 0 fue entre 20 y 30 ciliados/ml. Los ciliados utilizados como inóculo siempre se encontraban en fase de crecimiento estacionaria temprana. Para obtener este cultivo-inóculo, los ciliados mantenidos en la colección de cultivo eran transferidos tres o cuatro días antes de su utilización a un medio fresco de agua de mar estéril (o volvic) más las bacterias en suspensión (10^7 bacterias / mililitro). El volumen de inóculo a utilizar se calculó fijando parte del cultivo previamente y contando el número de células/mililitro en una cámara de sedimentación de Sedgewick-Rafter.

Durante el estudio de estas curvas de crecimiento, para cada uno de los ciliados, se localizaron los mayores

cambios morfológicos producidos en estos para su estudio morfológico tanto en vivo como después de la aplicación de tinciones.

La tasas de crecimiento específicas fueron calculadas en estas condiciones para todos los clones, aplicando la ecuación:

$$\mu = \ln (N_t/N_0) \cdot t^{-1}$$

resuelta sobre la región lineal en fase exponencial de las curvas de crecimiento de cada clon representadas en escala semilogarítmica (logaritmos del número de células contadas frente al tiempo) (Pirt, S.J., 1975; Ohman and Snyder, 1991).

Los tiempos de duplicación se obtuvieron aplicando la ecuación:

$$T_D = \ln 2 \cdot \mu^{-1}$$

El rendimiento (producción celular) obtenido para cada uno de los clones fue considerado como la concentración de células alcanzada al llegar a la fase estacionaria (N) en función de la concentración original de bacterias utilizada. El rendimiento neto se calculó como la diferencia entre el número final de células alcanzando la fase estacionaria (N) y el original al comienzo de la fase exponencial (N_0).

3.3.2. Curvas de calibrado:

Bacterias/mililitro vs. Absorbancias (600 nm)

La concentración final de bacterias en el medio utilizado para los cultivos estáticos (en batch), fue determinada por medio de una curva de calibrado realizada

con las medidas de absorbancias a 600 nm de distintas suspensiones de bacterias frente a conteos directos en hemocitómetro de las mismas (Curds, C.R. y Cockburn, A., 1968).

Para la preparación de las distintas concentraciones de bacterias, estas fueron cultivadas en caldo nutritivo (SWNB o FWNB). *Vibrio natriegens*, fue cultivada en matraces de 1000 ml Erlenmeyer de policarbonato con 500 ml de caldo de peptona/extracto de levadura, en incubadora orbital a 18°C, durante 15 horas, que es cuando esta bacteria, en estas condiciones, alcanza la fase estacionaria (Dr. M. Ohman, comunicación personal).

El cultivo fue repartido en 10 tubos de centrífuga de policarbonato (Nalgene®) de 50 ml, con tapón a rosca, previamente esterilizados. Los tubos fueron centrifugados a 11.000 RPM a 4°C durante 10 minutos. Después de eliminar el sobrenadante, el precipitado de bacterias fue resuspendido en agua de mar estéril, volviéndose a centrifugar en las condiciones ya citadas. Este proceso de lavados se llevó a cabo tres veces, quedando los 500 ml de cultivo reducidos a 50 ml de suspensión muy concentrada de bacterias, en agua de mar. Con esta suspensión stock de bacterias, se preparó un banco de diluciones de concentraciones de bacterias decrecientes, cuyas absorbancias fueron medidas en un espectrofotómetro Unicam modelo SP6-200 a 600 nm y en cubetas desechables de 1 cm. Las distintas suspensiones fueron posteriormente fijadas con una solución acificada de Lugol (Pomroy, A.J., 1984; Ohman and Snyder, 1991) y contadas en un hemocitómetro de Neubauer.

Este mismo procedimiento se utilizó con las bacterias en el caso del cultivo de ciliados de agua dulce, esto es *Enterobacter aerogenes* y la estirpe RBM-1 aislada de una de las muestras (planta piloto de RZM). Las estirpes en

estos casos, fueron cultivadas en caldo nutritivo (FWNB), el resto del proceso fue igual excepto en el lavado, en el que se utilizó agua mineral de Volvic estéril.

Sobre ambas variables (absorbancias y número de bacterias por mililitro) se aplicó una transformación logarítmica (Sokal, R.R. y Rohlf, F.J., 1981) ya que la verdadera relación entre ambas queda descrita por la fórmula:

$$\bar{Y}=aX^b$$

entonces se calculó la ecuación de regresión que quedó modificada de la siguiente forma:

$$\overline{\log Y}=\log a+b\log X$$

cuya resolución se llevó a cabo de la manera convencional. Los resultados de las rectas de regresión y ecuaciones se exponen en las Figuras 2, 3 y 4, respectivamente.

3.3.3. Estudio trofodinámico comparativo de dos clones de Uronema

Tras el estudio llevado a cabo con todos los clones en condiciones de cultivo standard, se observó cierta variabilidad en los parámetros trofodinámicos principalmente entre los ciliados marinos y los de agua dulce, a pesar de la gran similitud morfológica existente entre ellos, por lo que se realizó un estudio comparativo entre dos de sus clones. Este estudio fue llevado a cabo únicamente con el clon marino de Uronema marinum (CCAP no.1686/2) y el clon de agua dulce SRBM, tomando un enfoque comparativo entre ambos clones en cuanto a su

comportamiento trofodinámico en las mismas condiciones de cultivo. Los experimentos se llevaron a cabo como ya se ha explicado anteriormente para el crecimiento del resto de los clones, en condiciones de cultivo standard, con las tres estirpes bacterianas distintas ya descritas, *Vibrio natriegens*, *Enterobacter aerogenes* y RBM-1 a concentraciones 10^6 , 10^7 y 10^8 bacterias/ml.

Las tasas de crecimiento específicas, así como los tiempos de duplicación fueron calculados en experimentos de crecimiento, por triplicado, de los dos ciliados para cada una de las estirpes, a las concentraciones señaladas.

Las tasas de crecimiento máximas (μ_{\max}) y las constantes de saturación (Michaelis-Menten = K_M) para cada uno de los ciliados fueron obtenidas por aproximación sobre la representación doble recíproca de las tasas de crecimiento específicas (μ) frente a la concentraciones bacterianas.

Vibrio natriegens

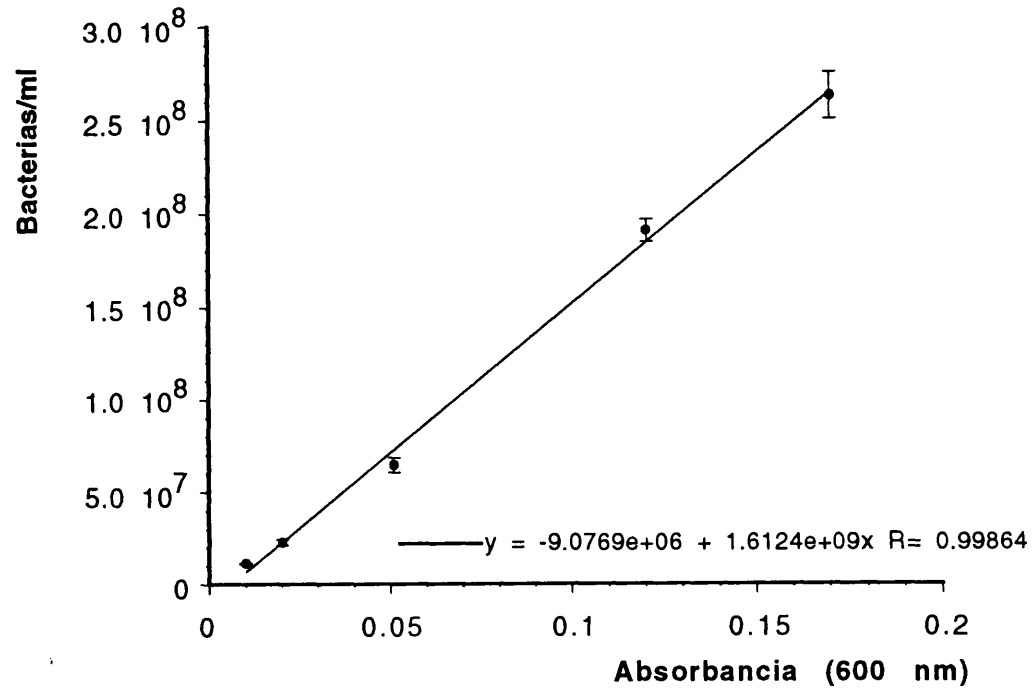


Figura 2.- Curva de calibrado de *Vibrio natriegens*
NCIMB#857

Enterobacter aerogenes

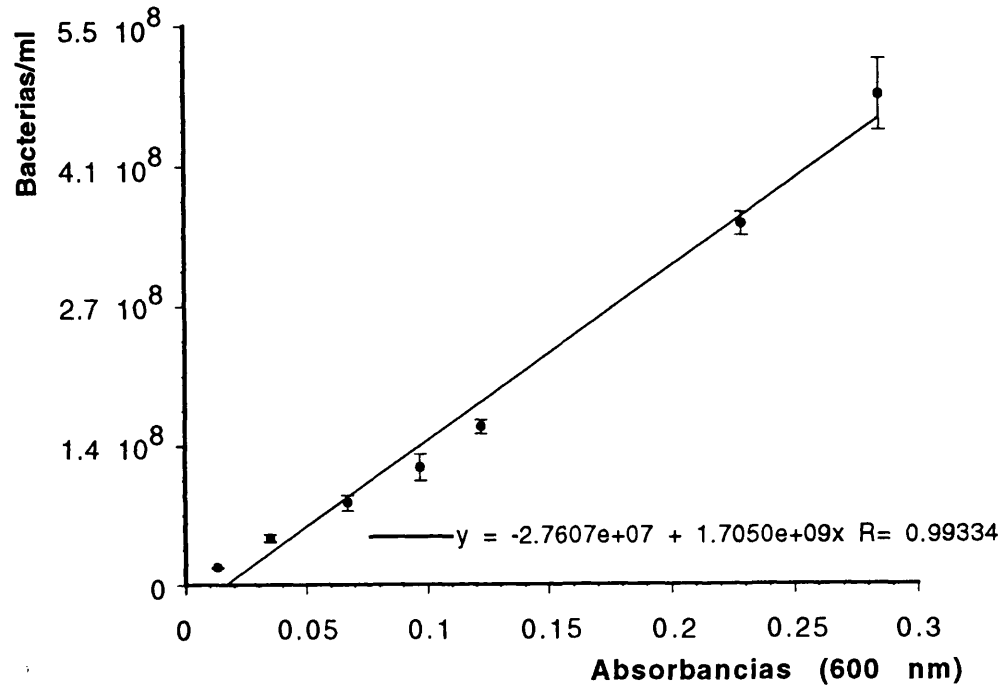


Figura 3.- Curva de calibrado de *Enterobacter aerogenes* (#1808 - Surrey University).

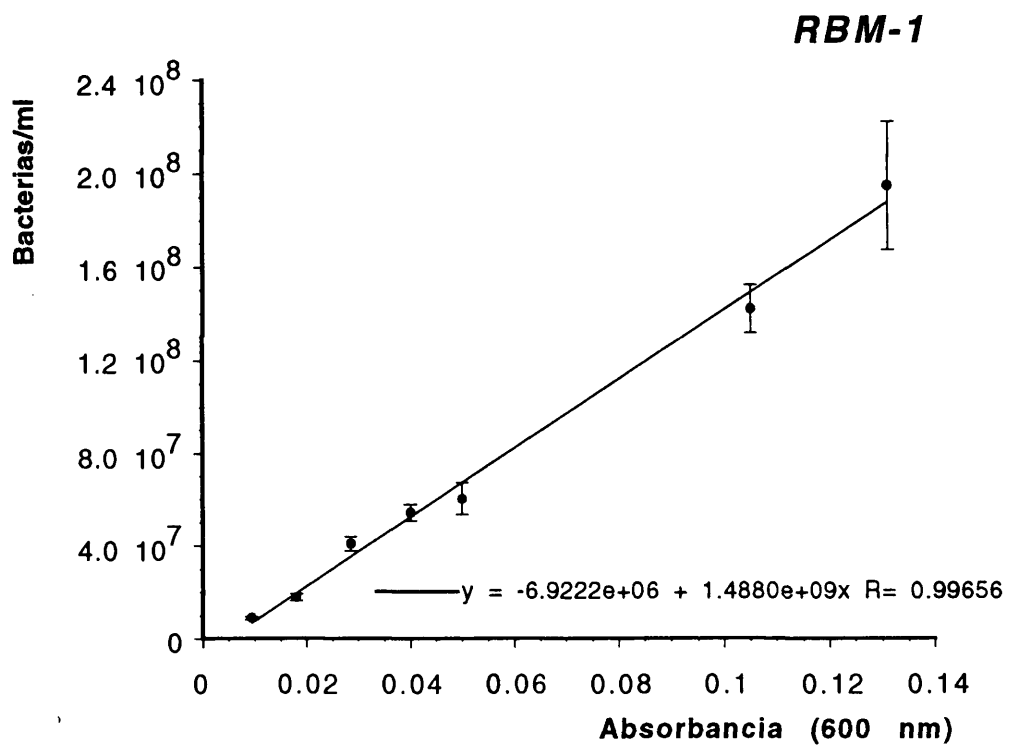


Figura 4.- Curva de calibrado de la estirpe RBM-1.

3.4. ESTUDIO MORFOLÓGICO

La primera parte del estudio morfológico en condiciones de cultivo estático (en batch), fue la determinación de los parámetros trofodinámicos de crecimiento de cada ciliado en condiciones de cultivo estándar explicados en el apartado anterior. Los cambios morfológicos más notables observados durante estos experimentos, fueron localizados en las curvas de crecimiento en las fases exponencial y estacionaria. En efecto, el volumen celular se incrementó aproximadamente de dos a seis veces, después del comienzo de la fase exponencial, disminuyendo de nuevo al pasar a la fase estacionaria (Lámina 1). Esta fue la principal razón para la selección de estos tiempos para los muestreos y estudio morfológico posterior en cada uno de los ciliados.

3.4.1. Microscopía óptica

Con los ciliados muestreados, como se ha indicado en el punto anterior, en las dos fases se llevaron a cabo grabaciones en video *in vivo*, y tras las tinciones con sales de plata: carbonato de plata amoniacal (Fernández-Galiano, D., 1976), nitrato de plata o técnica de Chatton-Lwoff (Corliss, J.O., 1953; Roberts, D.M. y Causton, H., 1988; Foissner, W., 1991), y protargol (Foissner, 1991).

Los datos tomados en las observaciones sobre las impregnaciones para cada fase de crecimiento exceptuando las medidas de las que se hablará en un punto más adelante (Digitalización de imágenes: DIGIT. Figura 6) fueron las siguientes:

Infraciliación somática:

Número de cinetias y su situación unas con respecto a otras. La primera y última cinetias fueron tomadas como puntos de referencia para otras estructuras.

Número de cinetosomas por cinetia, que se contó en ambas fases de crecimiento, en la primera y última cinetias normalmente. A veces también se tomaron al azar medidas en alguna de las otras cinetias. normalmente sobre un número no menor de 30 células.

Complejo basal del cilio caudal

Infraciliación oral:

Policinetia 1 o M1, situación con respecto a la última cinetia, número de cinetosomas, forma (nitrato de plata), si es ciliada o no, etc.

Policinetia 2 o M2, situación con respecto a M1, la haplocinetia y la última cinetia, número de cinetosomas y su disposición.

Policinetia 3 o M3, situación con respecto a M2, la haplocinetia y la última cinetia, número de cinetosomas (si fue posible observarlos) y disposición de estos.

Haplocinetia, forma, disposición con respecto a M2 y la última cinetia somática, número de cinetosomas (si fue posible contarlos).

Vestigio del escutico, situación y composición cinetosómica.

Macronúcleo:

Forma, tamaño y disposición.

Micronúcleo

Presencia observable o no, forma y disposición con respecto al macronúcleo.

Poros de la vacuola contráctil, su situación.

Citopigios, situación.

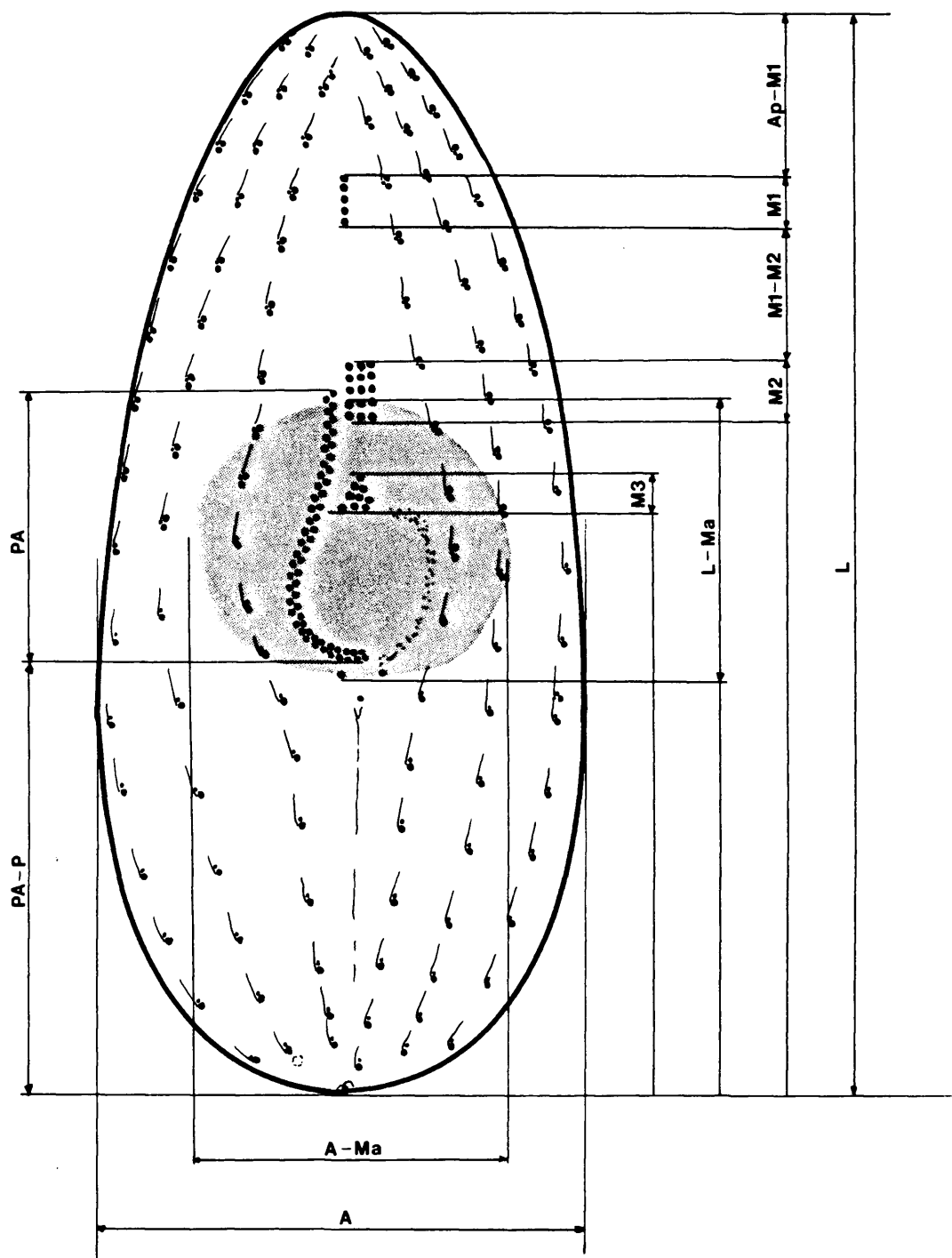


Figura 5.- Medidas tomadas sobre las células con DIGIT.

3.4.1.1. Técnicas de Impregnación

Técnica de Carbonato de plata amoniacal
(Fernández-Galiano, 1976)

La técnica utilizada para los ciliados marinos basada en la publicación original (Fernández-Galiano, 1976) fue ligeramente modificada de la siguiente manera:

- 1) La fijación se llevó a cabo con una concentración final en muestra de formol no mayor del 2%. La solución de formol utilizada fue al 40% y tamponada a saturación (aproximadamente el 4%) con borax (Borato sódico anhidro) (Steedman, 1985). La fijación se dejó actuar un mínimo de tres minutos y entonces los ciliados fueron lavados sucesivamente tres veces, con agua mineral de volvic. Los lavados se llevaron a cabo por centrifugado a 1500-2000 RPM, resuspendiendo los ciliados en agua destilada.
- 2) Los ciliados concentrados en el último lavado fueron resuspendidos en agua destilada hasta un volumen de cinco mililitros y después se añadieron de nuevo tres gotas de formol al 40%.
- 3) En este orden, se añadieron:
 - 15 gotas de una solución de peptona al 4%.
 - 10 gotas de piridina pura.
 - 5 mililitros de agua destilada.
 - 1 ml de solución de carbonato de plata amoniacal (Río-Hortega).
- 4) La mezcla se colocó al baño maría a 65°C hasta que se produjo el viraje de ésta a un color cognac, entonces se retiró del baño y se añadieron 10 ml de agua destilada fría.

La tinción así preparada, se mantuvo por varias semanas en buenas condiciones para su estudio.

Para el caso de los ciliados de agua dulce, el proceso se llevó a cabo, eliminando el primer punto, sobre 5 ml de un cultivo fijado con 3 gotas de formol al 40%. El resto de la tinción fue exactamente igual que para el caso de los ciliados marinos, excepto en el caso de la peptona, que se utilizó exactamente el doble (30 gotas).

Los datos de los reactivos utilizados se pueden encontrar en el Anexo 1.

Técnica de Chatton-Lwoff

Para esta técnica se utilizó la modificación desarrollada en el laboratorio de protistas del Natural History Museum de Londres (Roberts and Causton, 1988).

El procedimiento utilizado fue el siguiente:

- 1) Un volumen de 10 ml de cultivo fue concentrado por centrifugación. Las células concentradas en un volumen de aproximadamente 0.5 ml fueron fijadas con "Champy", en una relación muestra:fijador de 1:1.5 durante tres minutos.
- 2) Se lavó una vez en fijador de Da Fano, rellenando el mismo tubo con dicho fijador. Se centrifugó y se eliminó el sobrenadante, resuspendiendo las células en agua destilada. Se dejó reposar por un minuto y se centrifugó de nuevo eliminando el sobrenadante. El concentrado de células fue resuspendido moviendo el tubo ligeramente.
- 3) A la vez que se procedía con la concentración y la

fijación, un vial de 2 ml de gelatina (15% en agua destilada) fue derretido a 40°C (Anexo 1). En el momento de su utilización se añadió 1 ml de fijador de Da Fano y se mezcló bien. Tres o cuatro gotas de esta mezcla se depositaron en el tubo de centrífuga con las células fijadas y lavadas, se homogeneizó bien y una pequeña gota fue depositada sobre un cubre del número 1. Rápidamente la gota se extendió por el resto del cubre con la ayuda de una aguja histológica. Todos los cubres así preparados se fueron depositando sobre una bandeja con papel de filtro, humedecido con agua muy fría. Así se prepararon hasta siete cubres para cada tubo de centrífuga con células.

- 4) Los cubres fueron colocados en una jarra de tinciones de Columbia con una solución al 3% de nitrato de plata. Dicha jarra se mantuvo así durante 5 minutos y otros 5 minutos bajo una lámpara de rayos ultravioleta, tras lo cual los cubres se colocaron en otra bandeja con papel de filtro y se cubrieron con agua muy fría. Dicha bandeja se colocó de nuevo bajo la lámpara de ultravioletas durante 15 minutos.
- 5) Los cubres se lavaron tres veces en agua destilada muy fría y después se procedió a su deshidratación en una serie de diluciones de alcohol isopropílico en el orden: 30 - 50 - 70 - 98 - 100 - 100%. Tras la deshidratación, los cubres fueron aclarados en dos pasos por xileno y después montados con bálsamo de Canadá en xileno.

Los reactivos y su composición se detallan en el Anexo

1.

La técnica de protargol que se ha utilizado en este trabajo fue la de Foissner (Foissner, 1991), procedimiento A) con ligeras modificaciones. La tinción fue llevada a cabo de la siguiente manera:

- 1) Los ciliados fueron fijados con una solución concentrada de Bouin (Anexo 1) en una proporción muestra:fijador de 19:1 para los ciliados de agua dulce o 10:1 para los ciliados marinos. La fijación se dejó actuar durante un mínimo de 12 horas.
- 2) Los organismos fueron concentrados por centrifugación y lavados con agua destilada dos o tres veces.
- 3) Los portas a utilizar, fueron limpiados con alcohol y flameados, para eliminar toda traza de grasa en su superficie.
- 4) Una gota de albúmina de Mayer fue colocada en el centro del porta junto con una pequeña gota de células concentradas. Se mezcló bien con la ayuda de una aguja histológica y se extendió en una capa muy fina sobre el tercio central del porta.
Los portas así preparados se dejaron secar al aire un mínimo de doce horas.
- 5) Tras este tiempo, los portas fueron colocados en una jarra de tinciones con alcohol isopropílico de 98% durante 30 minutos. Este proceso coagula la albúmina que toma un aspecto opaco.
Al mismo tiempo se preparó una jarra de tinción con una solución de protargol al 0.4%, que se colocó al baño maría a 60°C.
- 6) Los portas fueron rehidratados a través de un paso en

alcohol isopropílico al 70% y dos más, en agua destilada de 5 minutos cada uno.

- 7) Los portas fueron colocados en una solución de permanganato potásico al 0.2%. El tiempo óptimo estimado (Foissner, 1991), fue de 90 segundos. Este tiempo es determinado proporcionalmente en relación con la inmersión posterior en ácido oxálico. Los portas fueron entonces sucesivamente sumergidos y después mantenidos en una jarra de tinciones con agua del grifo durante 5 minutos.
- 8) Los portas se transfirieron a continuación a otra jarra de tinciones con una solución de ácido oxálico al 2.5% donde se mantuvieron por 195 segundos, tiempo establecido proporcionalmente con la permanencia previa en permanganato; después fueron lavados tres veces en agua del grifo donde se mantuvieron un mínimo de 5 minutos.
- 9) Los portas fueron entonces impregnados en la solución de protargol al 0.4% previamente precalentada a 60°C al baño maría, donde se mantuvieron durante 12 minutos. Transcurrido este tiempo la jarra de tinciones se mantuvo fuera del baño por otros 10 minutos.
- 10) Para la determinación de la cantidad de revelador a utilizar, se utilizó uno de los portas en la solución de protargol, sobre el cual se extendió directamente en su superficie la solución reveladora (Anexo 1), que fue preparada en el momento de su utilización. Para parar el proceso de revelado, el porta se aclaró en agua del grifo y entonces se introdujo en una solución fijadora de tiosulfato sódico al 2.5%. Después se observó al microscopio. Normalmente el revelador tuvo que ser diluido a la mitad o un

tercio, siendo mantenido tan sólo unos segundos (4-6 segundos). Se procedió, entonces, con el resto de los portas, aclarándolos en agua y manteniéndolos después en la solución de tiosulfato sódico durante 5 minutos.

- 11) Se procedió al lavado de los portas en agua del grifo dos veces, cinco minutos en cada lavado y se deshidrató en una serie de alcohol isopropílico 50 - 70 - 100 - 100 % durante cinco minutos cada paso.
- 12) Los portas fueron finalmente aclarados en dos pasos de xileno de 10 minutos cada uno.
Los cubres se montaron con bálsamo de Canadá en xileno.

La técnica del protargol cuantitativo o QPS (quantitative protargol staining) de Montagnes y Lynn, (Montagnes, D.J.S. y Lynn, D.H., 1987), fue utilizada en principio, sin embargo, la calidad de la tinción fue mucho peor que la obtenida con la técnica explicada aquí.

3.4.1.2. Microscopios y video

El aislamiento de los ciliados se llevó a cabo con una lupa binocular Olympus modelo SZH-ILLB.

Las observaciones en vivo, tinciones, y conteos para las curvas de crecimiento, se llevaron a cabo en un microscopio Olympus BH-2 equipado con campo claro, contraste de fase e interferencia. Dicho microscopio lleva acoplada una cámara de vídeo JVC modelo KY-30 de alta resolución, conectada con un vídeo Sony VO-9850P y dos pantallas de televisión. El vídeo a su vez está conectado con un terminal de ordenador IBM 6151-130 en el que con UNIX, como sistema operativo, fue instalado el programa

DIGIT, diseñado en el departamento de Zoología del Natural History Museum (Londres), para la toma de medidas en dos dimensiones sobre imágenes, tanto directamente del microscopio, como en grabaciones de vídeo.

Las fotografías fueron tomadas en otro microscopio Olympus BH-2 equipado con equipo fotográfico Olympus modelo PM-10AD.

Algunas de las fotografías en campo claro y la técnicas de fluorescencia fueron llevadas a cabo con un microscopio Leitz-Aristoplan, equipado con campo claro, contraste de fase y microscopía de fluorescencia (filtros N2.1, I3 y L3). Dicho microscopio porta una cámara con dispositivo de exposición automática Wild-Leica Photoautomat MPS 46/52.

3.4.1.3. Digitalización de imágenes: DIGIT

Los datos morfológicos fueron tomados tanto sobre células vivas como sobre células teñidas con la técnica de carbonato de plata, nitrato de plata o técnica de Chatton-Lwoff y protargol, respectivamente. Para poder llevar a cabo las medidas, las imágenes de ciliados fueron grabadas en video de alta resolución gracias a la cámara acoplada al microscopio. Posteriormente las imágenes fueron extraídas por medio del programa digitalizador de imágenes DIGIT (Figura 5). Este programa es capaz de proveer coordenadas de diferentes puntos en las imágenes, así como distancias entre puntos.

En el caso de las grabaciones de las células en vivo, los ciliados fueron concentrados por centrifugación. Dos gotas de células concentradas fueron depositadas en un porta excavado, sobre el que se colocó un cubre, por cuyos bordes se había extendido un poco de vaselina. Las imágenes

de las células fueron tomadas con un objetivo de x40, con microscopía de interferencia. En este caso las únicas medidas tomadas fueron longitud y anchura celulares.

Las medidas tomadas sobre los ciliados teñidos, fueron determinadas dependiendo de las características de cada método de impregnación. En todos los casos, los individuos elegidos debieron satisfacer los siguientes criterios: (a) orientados con la superficie ventral hacia arriba y el área bucal ventral, (b) el eje longitudinal celular paralelo en lo posible a la superficie del cubre, (c) lo suficientemente bien teñidos para poder medir los caracteres elegidos en cada una de las tinciones. La Figura 6 muestra los puntos utilizados en las imágenes de células con DIGIT sobre los que se obtuvieron coordenadas, en el caso que dichas estructuras fueran observables. Aunque sólo ciertas distancias fueron medidas directamente sobre las imágenes, la obtención de coordenadas permitió el cálculo posterior de otras distancias celulares. Además, gracias a la obtención de las medidas de los ejes mayor y menor celulares, se pudo calcular el volumen celular (Burkill, 1978). Este fue calculado asumiendo una forma celular como de pera, cuya mejor aproximación geométrica es la de un elipsoide (Burkill, 1978). El volumen de dicha figura geométrica viene expresado como:

$$V = \frac{1}{6} \pi abc$$

donde:

a es el eje mayor o la longitud del ciliado

b es el eje menor o la anchura del ciliado

c es el segundo eje menor o la profundidad del ciliado

En los cálculos se asumió que $b=c$.

La técnica de impregnación del carbonato de plata

amoniacal permitió la toma de las medidas de longitud y anchura celulares, longitud (eje paralelo al eje mayor celular) y anchura de macronúcleo y micronúcleo, tamaño de policinetias M1, M2 y M3, tamaño de haplocinetia paroral y tamaño del área bucal (B) considerada como distancia desde el extremo anterior de la policinetia M1 hasta el extremo posterior de la haplocinetia paroral. Algunos otros datos fueron calculados posteriormente puesto que se tomaron las coordenadas de los distintos puntos en la superficie, como por ejemplo, las distancias entre las policinetias y de la boca a ambos extremos celulares. Dichos datos proporcionaron información sobre la forma del crecimiento celular en cada uno de los clones.

En el caso de la técnica de Chatton-Lwoff, las medidas tomadas fueron longitud y anchura celulares, longitud (eje paralelo al eje mayor celular), tamaño de policinetias M1, M2 y M3, tamaño de policinetia paroral y tamaño del área bucal considerada, como en el caso anterior, como la distancia desde el extremo anterior de la policinetia M1 hasta el extremo posterior de la policinetia paroral, así como algunos otros datos de situación de dichas estructuras en la superficie celular durante el crecimiento. Esta técnica no proporcionó ningún dato nuclear, ya que dichas estructuras no son teñidas en esta tinción.

La técnica de Protargol permitió la toma de las medidas de longitud celular, anchura celular, longitud del macronúcleo (eje paralelo al eje mayor celular), anchura del macronúcleo, longitud del micronúcleo (eje paralelo al eje mayor celular) y anchura del micronúcleo.

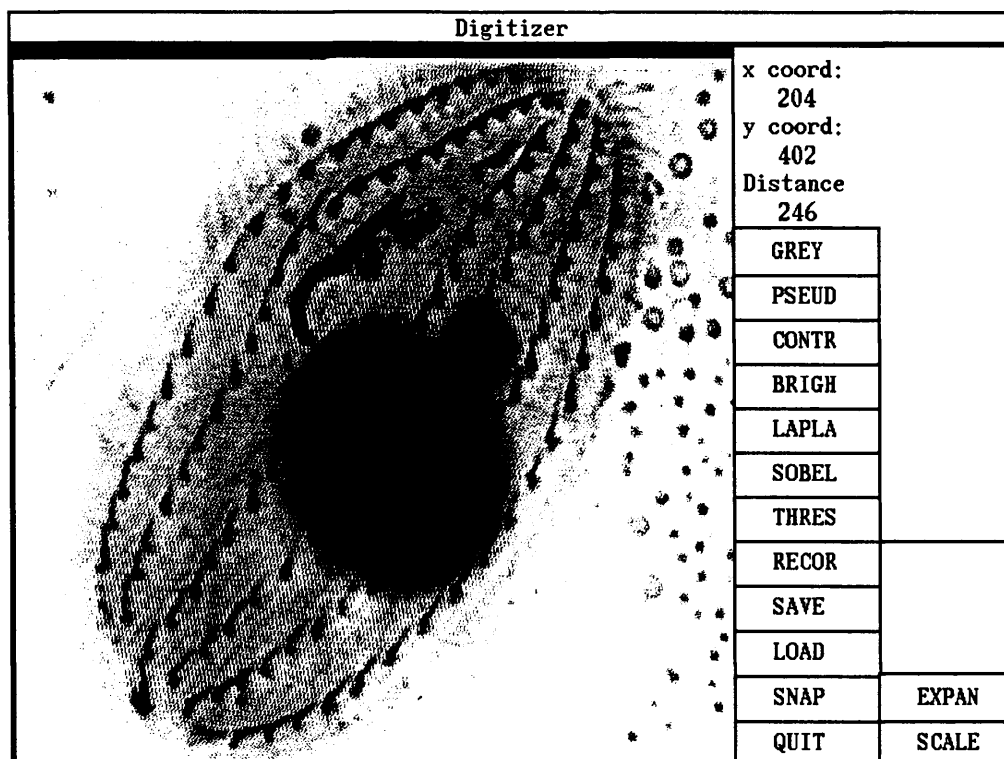


Figura 6.- Programa digitalizador de imagenes DIGIT:
clon Cil7.

3.4.2.1. Microscopía electrónica de barrido

Los cultivos de ciliados fueron concentrados por centrifugación a 2000 RPM durante 10 minutos. El volumen final al que se llegó fue de aproximadamente 0.5 a 1 ml de cultivo. El procedimiento llevado a cabo entonces fue el descrito por Valvonesi y Luporini (Valvonesi, A. y Luporini, P., 1990). Los ciliados fueron fijados con un volumen igual de fijador modificado de Parducz (Parducz, 1967), durante 30 minutos a 4°C.

Los ciliados así fijados se lavaron dos veces con tampón cacodilato sódico 0.1 M (pH=7.4) y se montaron sobre cubres circulares de 13 mm de diámetro previamente tratados durante dos horas con una solución al 2% de D-Polilisina (peso molecular entre 70.000-150.000) preparada con agua destilada estéril.

Los cubres se dejaron secar durante al menos 12 horas, y antes de ser utilizados fueron lavados en agua destilada estéril para eliminar el exceso de polilisina. A continuación fueron cubiertos con tampón cacodilato sódico 0.1 M, sobre el que se dejaron caer varias gotas de los ciliados en el mismo tampón. Los ciliados se dejaron así durante varios minutos dando tiempo a la sedimentación de éstos sobre el cubre y, por lo tanto, permitiendo su fijación. Los cubres fueron sucesivamente deshidratados en una serie de alcohol isopropílico 30-50-70-85-98-100-100% durante 10 minutos en cada paso. La deshidratación se continuó con varias soluciones de alcohol isopropílico-acetona (75:25, 50:50, 25:75, 100, 100%) durante 10 minutos cada una.

Los cubres fueron desecados en una cámara de punto

crítico Balzers modelo CPD030. Posteriormente, los cubres fueron montados con araldite sobre stubs para el microscopio electrónico, y cubiertos con una mezcla de oro-paladio en un aparato sputter Polaron modelo E5000. Las observaciones fueron llevadas a cabo en un microscopio electrónico de barrido Hitachi modelo S800.

3.4.2.2. Microscopía electrónica de transmisión

Los ciliados fueron concentrados por centrifugación a 2000 RPM. Las células fueron entonces fijadas con una solución de glutaraldehído al 2.5% en tampón de cacodilato sódico más un 6% de sacarosa para el caso de los ciliados marinos. La fijación con glutaraldehído se llevó a cabo durante 30 minutos en hielo picado.

El fijador se eliminó con dos lavados por centrifugación con tampón cacodilato sódico. Entonces las células fueron fijadas con una solución de tetróxido de osmio al 1% en tampón de cacodilato sódico durante dos horas. El fijador fue lavado por centrifugaciones sucesivas con tampón de cacodilato sódico.

La deshidratación fue llevada a cabo en una serie de soluciones de acetona 25-40-50-70-90-100-100-100%. Los ciliados ya deshidratados y en acetona 100%, fueron transferidos a un tubo eppendorf de 1.5 ml donde se realizó la inclusión en resina de Spurr sustituyendo la acetona sucesivamente en tres o cuatro pasos. Primero se eliminó parte de la acetona en la superficie del tubo y se añadió aproximadamente la misma cantidad de resina que de acetona quedaba en el tubo. Este paso se dejó reposar un mínimo de 12 horas y entonces se procedió de la misma manera dos veces, pero esta vez se dejó reposar tan sólo un par de horas en cada cambio de resina. Finalmente, la polimerización de la resina se llevó a cabo en un horno a

70°C durante un mínimo de 24 horas en el mismo tubo.

Los cortes ultrafinos fueron llevados a cabo amablemente por K. Clarke (FBA. Windermere) con una cuchilla de diamante Micro-star, en un ultramicrotomo Reichert-OmUT. Los cortes fueron teñidos con una serie de citrato de plomo-acetato de uranilo-citrato de plomo.

Las observaciones fueron llevadas a cabo en un microscopio JEOL JEM 100CS TEM Scan en el IFE⁵.

3.5. HIBRIDACIONES CON SONDA MOLECULAR ESPECIFICA DE U. MARINUM

Esta parte del estudio se realizó en colaboración con la unidad de Biología Molecular del Departamento de Zoología del Natural History Museum de Londres. El estudio se basó en un proceso de hibridación con una sonda molecular (oligonucleótido), marcada fluorescentemente con Tetrametil-Rodamina, sobre los clones aislados (Embley, T.M. y col., 1991; Dyal, P.L. y col., 1992).

La sonda, específicamente diseñada para la identificación de Uronema marinum por la unidad de Biología Molecular, sólo es capaz de hibridar con una secuencia específica de rRNA de la subunidad pequeña de dicha especie de ciliado. La sonda fue sintetizada tomando como molde una de las regiones altamente variable de la secuencia de rRNA de la subunidad pequeña del ribosoma del clon Uronema marinum (CCAP no.1686/2) (Embley, T.M., 1991; Embley, Challons et al., 1991).

El experimento se llevó a cabo con todos los clones aislados, utilizando como control el clon de Parauronema

⁵ Institute of Freshwater Ecology. Windermere. Inglaterra

acutum, ya que dicho clon no hibridó en principio con la sonda específica y además su tamaño es ligeramente mayor que el de los clones de Uronema, facilitando la observación microscópica. Se utilizaron dos sondas, una la sonda específica para Uronema marinum marcada con Rodamina, y otra específica para eucariotas marcada con Fluoresceína (FITC) llevada a cabo como control positivo. El procedimiento de hibridación se llevo a cabo de acuerdo con el protocolo descrito por Stahl y Amman (Stahl, D.A. y Amann, R., 1991).

El protocolo inicial fue modificado ligeramente fijando primero las células a portas tratados previamente (Anexo 1) de la manera siguiente: las células fueron concentradas por centrifugación aproximadamente a 2000 RPM durante 10 minutos. Entonces fueron fijadas con una solución fijadora de paraformaldehído en PBS (Anexo 1) en una proporción de muestra:fijador de 1:3. Las células fueron concentradas por centrifugación de nuevo y transferidas a tubos eppendorf que fueron mantenidos toda la noche a 4°C.

A continuación, los tubos fueron rápidamente centrifugados a 6000 RPM y eliminando un poco de sobrenadante las células fueron resuspendidas en una solución de Nonident P-40 al 0.1%. La inclusión de las células en este detergente no-ionico impide la formación de flóculos sin producir daños aparentes en las células. Después se añadieron cinco microlitros de la suspensión de Parauronema acutum a todas las suspensiones de los distintos clones como control negativo del proceso de hibridación. Posteriormente dos gotas de cinco microlitros de la mezcla de cada clon con P.acutum, fueron situadas a ambos extremos de un porta tratado previamente con gelatina (Anexo 1). Las gotas se dejaron secar al aire y después se deshidrataron en una serie de alcohol etílico de 50 - 80 - 95% durante tres minutos en cada uno de ellos. Los portas

fueron de nuevo secados al aire. Tras este paso los portas se pueden mantener indefinidamente en una caja herméticamente cerrada.

La segunda parte del proceso, fue la hibridación propiamente dicha. Este proceso fue llevado a cabo en cámara húmeda para evitar la pérdida por evaporación de la solución de hibridación. Dicha cámara fue preparada con dos contenedores de plástico con un doble papel de filtro humedecido con una solución de Cloruro sódico 0.9 M. Dichos contenedores fueron mantenidos en un baño estable a 48°C, antes de ser usados, así como el tampón de hibridación (Anexo 1).

Sobre cada una de las gotas de ciliados anteriormente preparadas sobre los portas, se colocó la solución de hibridación que consta de 18 µl de tampón de hibridación (Anexo 1), 1 µl de sonda eucariótica universal y 1 µl de sonda específica para Uronema marinum. Se colocó un cubre, se selló con laca de uñas transparente, para evitar la evaporación de la mezcla de hibridación, y se dejó secar al aire. Todos los portas así preparados se colocaron en los contenedores de plástico, previamente preparados, donde fueron incubados a 48°C, durante un mínimo de tres horas.

Los cubres, tras el proceso de incubación, se retiraron rápidamente con un escalpelo, tratando de evitar el área donde las células quedaron adheridas y lavando los portas sucesivamente tres veces durante quince minutos en el tampón de lavado (Anexo 1) mantenido a 48°C.

Finalmente, los portas se aclararon en agua destilada dos o tres veces hasta que se eliminó toda traza del tampón de lavado. Después se dejaron secar al aire y posteriormente se mantuvieron en completa oscuridad a 4°C hasta su observación.

Las observaciones se llevaron a cabo con un microscopio de fluorescencia Leitz-Aristoplan equipado con una lámpara de mercurio y objetivos NPL-Fluotar. Los bloques de filtros específicos para la fluorescencia emitida (epifluorescencia) fueron N2.1 para la detección de rodamina (BP 515-560) (Rodamina B) y I3 (BP 450-490/LP 520) o L3 (BP 450-490/BP 525/20) para fluoresceína (FITC-isotiocianato de fluoresceína). Para las observaciones sobre cada grupo de células se colocó una gota de medio Vectashield o Citifluor y un cubre.

3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos sobre cada una de las variables, para cada tipo de tratamiento y en ambas fases de crecimiento se organizaron en cuatro matrices diferentes: 1) en vivo, 2) tras impregnación con carbonato de plata amoniacal, 3) con nitrato de plata y 4) con protargol. Cada matriz incluyó las variables tanto en fase exponencial como estacionaria de crecimiento para cada uno de los dieciséis clones estudiados. Los análisis o modelos utilizados se llevaron a cabo en los programas estadísticos Systat (1990) y Genstat-5 (Rothamsted Experimental Station, 1987).

La normalidad de las distribuciones se comprobó por medio del test no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov, procediendo a una transformación logarítmica sobre aquellas variables que se apartaron de la normalidad.

Las técnicas descriptivas o análisis univariantes utilizadas, fueron la media, desviación típica, valores máximos, mínimos y mediana.

El estudio sobre los clones, con cada una de las impregnaciones, de las posibles relaciones de asociación entre las distintas variables (en las dos fases de

crecimiento), se llevó a cabo por medio de un análisis de correlación (coeficiente de correlación de Pearson). Este análisis permitió el estudio de relaciones causales entre distintas variables por el crecimiento celular.

El análisis de la varianza (ANOVA) fue utilizado para comprobar si las diferencias entre las medias de las variables longitud y anchura celulares, variables comunes a todos los tratamientos considerados, en las diferentes fases de crecimiento y con los diferentes métodos de impregnación eran significativas. Este análisis fue aplicado tanto sobre todos los clones considerados en conjunto como por separado. Así en el caso de las fases de crecimiento, se consideraron los valores de las variables longitud y anchura celulares en ambas fases de crecimiento, esto es, exponencial y estacionaria. Los tratamientos considerados a la vez fueron las células en vivo, o tras las impregnaciones con carbonato de plata amoniacal, nitrato de plata o con protargol. El análisis se llevó a cabo en principio sobre todos los clones considerados en conjunto y posteriormente considerando cada clon independientemente.

Aunque los análisis univariantes explicados hasta ahora rinden cierta información sobre las relaciones entre los distintos clones para cada uno de las variables individualmente, es difícil determinar por medio de éstos cómo los diferentes clones están relacionados y cuáles son los caracteres más valiosos en la discriminación entre unos clones y otros, esto es, como los diferentes clones están relacionados en su complejidad multivariante. Las técnicas de análisis multivariable son valiosas precisamente en estos aspectos, cumpliendo objetivos descriptivos e inductivos, pero trabajando simultáneamente con varias variables en lugar de una sola (Blackith, R.E. y Reyment, R.A., 1971; Maxwell, A.E., 1977; Manly, F.J., 1986; Cuadras, C.M., 1991).

La técnica de análisis multivariante utilizada fue el análisis discriminante de variables canónicas (CVA). El análisis de variables canónicas es esencialmente una técnica discriminante, que analíticamente tiende a maximizar las distancias entre grupos, teniendo en cuenta las distancias dentro de cada grupo. Los resultados en esta técnica se expresan como la extracción de ejes derivados que sucesivamente contribuyen en proporción decreciente a la variación total en la muestra completa. Los ejes obtenidos, denominados variables canónicas, son analizados en su significación en términos de la separación de los grupos iniciales que proveen. Este análisis puede indicar que caracteres son los más importantes a la hora de producir la máxima discriminación entre grupos. Por lo tanto fue útil a la hora de dividir o incluir todas las observaciones en grupos distintos con respecto a las características observadas.

4. RESULTADOS

4.1. Descripciones morfológicas

El estudio morfológico clásico permitió la identificación clara de cinco morfotipos entre los clones estudiados. Así, se definieron como morfotipo número 1 a los clones marinos U.marinum (CCAP 1986/2) que fue el clon utilizado como referencia en este estudio y U.schewiakoffi, X2, Ta, AD2, AE21, Cil1, BBCil y Cil7 (Figura 7). El morfotipo número 2 incluye a los clones marinos AD1 y AE22 y a los de agua dulce SRBM y SCut2.1 (Figura 8). El morfotipo 3 incluye únicamente al clon Parauronema acutum (Figura 9). El morfotipo 4 corresponde al clon Cil3 (Figura 10) y por último, en el morfotipo 5 se incluye el clon SWil (Figura 11).

Los clones tipo 1 fueron los más similares al clon utilizado como referencia -el clon Uronema marinum (CCAP 1986/2)- cuya morfología coincide con la mayoría de las descripciones publicadas de la especie Uronema marinum (Borrór, A.C., 1963b; Thompson, J.C., 1964; Czapik, A., 1968; Thompson, J.C., 1972; Puytorac, P. de. y col., 1974). Los clones tipo 2 fueron claramente distintos de manera constante durante todo el estudio y en el cultivo en batch, del clon referencia U.marinum. Sin embargo, muchas de las publicaciones sobre especies similares a este clon han sido identificadas con U.marinum en unos casos (Párduez, B., 1939; Czapik, A., 1964; Jankowski, A.W., 1964; Cheung, P.J. y and?????, 1980; Téllez, C. y Fernández-Galiano, D., 1982) o U.nigricans en otros (Thompson, J.C. y Evans, F.R., 1968; Puytorac, Groliere et al., 1974; Agamaliev, F.G., 1978; Dragesco, J. y Dragesco-Kerneis, A., 1991; Song, W.B., 1991). El clon tipo 3 perteneciente al clon Parauronema acutum (CCAP clon) y diferente del resto de los clones estudiados, se justifica como perteneciente al género Parauronema como se observará más adelante. El clon tipo 4, que incluye al clon Cil3, se identificó como la especie U. elegans. Por último, el clon tipo 4 -clon SWil-

que se ha identificado con la especie Uronema filificum.

Las observaciones descritas en el presente apartado, se han llevado a cabo teniendo en cuenta las tres tinciones detalladas en el capítulo de material y métodos. Las observaciones más detalladas sólo pudieron obtenerse de ciliados teñidos con la impregnación de carbonato de plata amoniacal y con la técnica de Chatton-Lwoff o de nitrato de plata con las que se obtiene una calidad suficiente como para distinguir claramente pares de cinetosomas en estas especies, lo cual es bastante difícil con la técnica de protargol para este tipo de ciliados. Sin embargo, en algunos casos, con la técnica de carbonato de plata se pueden confundir los sacos parasómicos con cinetosomas, como se observará más adelante. Por esta razón, es muy importante considerar otra técnica de tinción con la que poder comparar, así como eventualmente la utilización de técnicas de microscopía electrónica (tanto de barrido como de transmisión) en los casos de identificación de estructuras no identificables con las técnicas de microscopía óptica.

Las cinetias se numeraron cinetia número 1 la primera situada a la derecha del área bucal; cinetia número 2 la segunda y así sucesivamente hasta la cinetia n, quedando ésta a la izquierda del área bucal (Téllez, C., 1980). Los pares de cinetosomas o cinetosomas sencillos presentes en algunas cinetias somáticas, como por ejemplo en el caso de la primera o la última cinetias somáticas, fueron utilizados como punto de referencia para determinar la situación de otras estructuras. En estos casos, para evitar complicaciones sintácticas (ya que se puede tratar tanto de pares de cinetosomas como de cinetosomas sencillos) se hablará de "posiciones cinetosómicas" en las cinetias. La nomenclatura que se ha utilizado para las estructuras que forman el área bucal, principalmente en lo referente a la haplocinetia, es la descrita por (Téllez, 1980), en la que

la haplocinetia se considera constituida por tres segmentos. El segmento A que corresponde a la parte anterior recta de la haplocinetia, el segmento B correspondiente a la parte curva y C o vestigio del escutico.

El número de cinetias se contó en ambas fases de crecimiento, sobre un número no menor de 30 células. Los cinetosomas por cinetia se contaron en la primera y ultima cinetias normalmente, aunque a veces también se tomaron al azar medidas en alguna de las otras cinetias. Los resultados se han representado como frecuencias relativas en las dos fases en total y para cada tipo de cinetia contada.

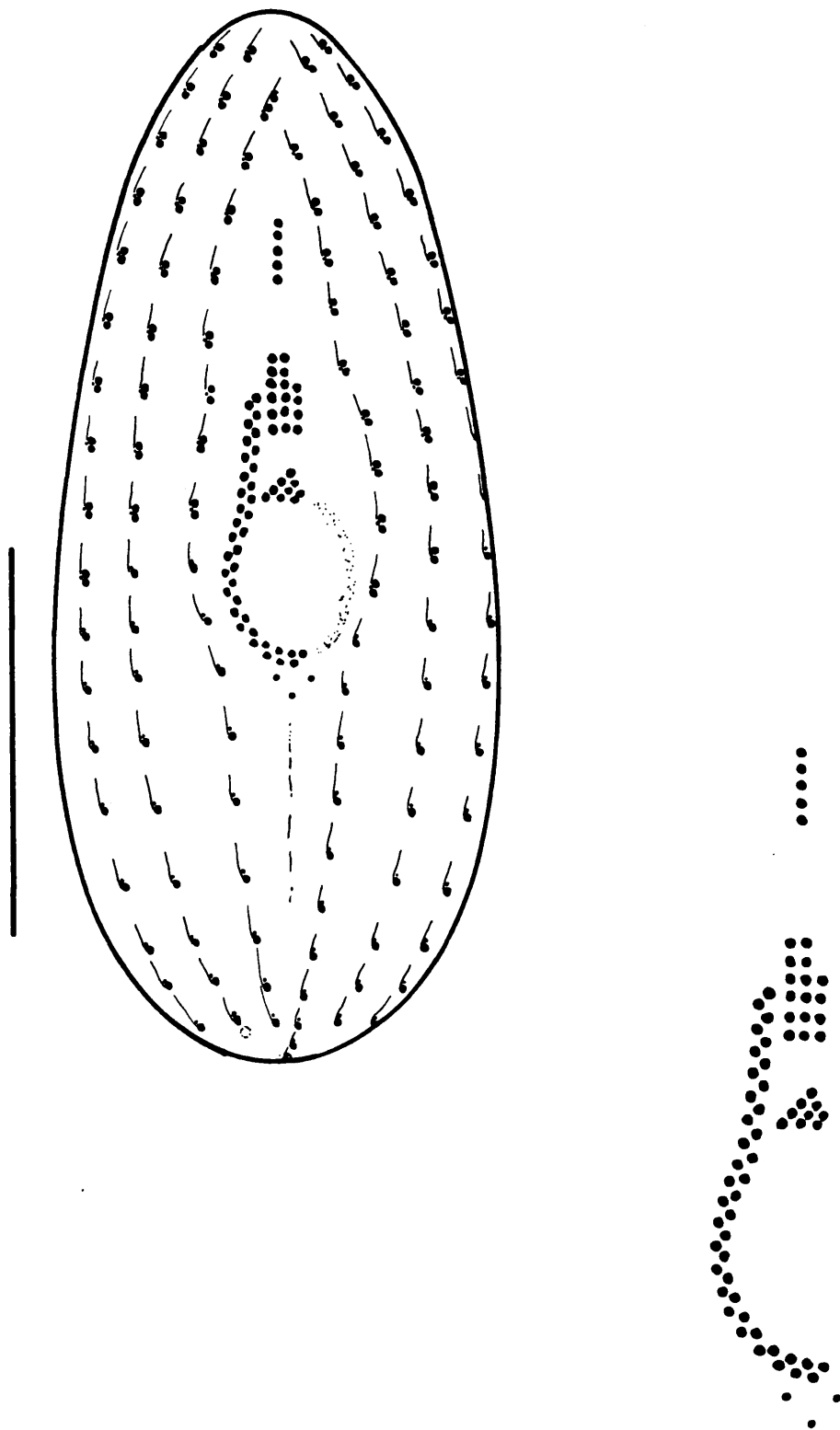


Figura 7.-

Morfotipo 1: U.marinum, U.schewiakoffi, X2,
Ta, AD2, AE21, Cil1, BBCil, Cil7.

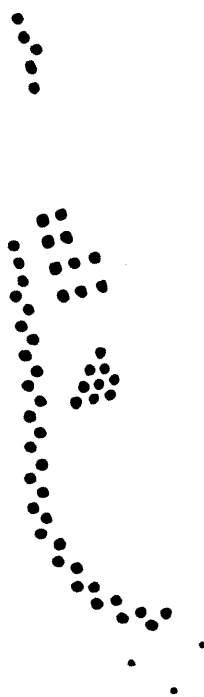
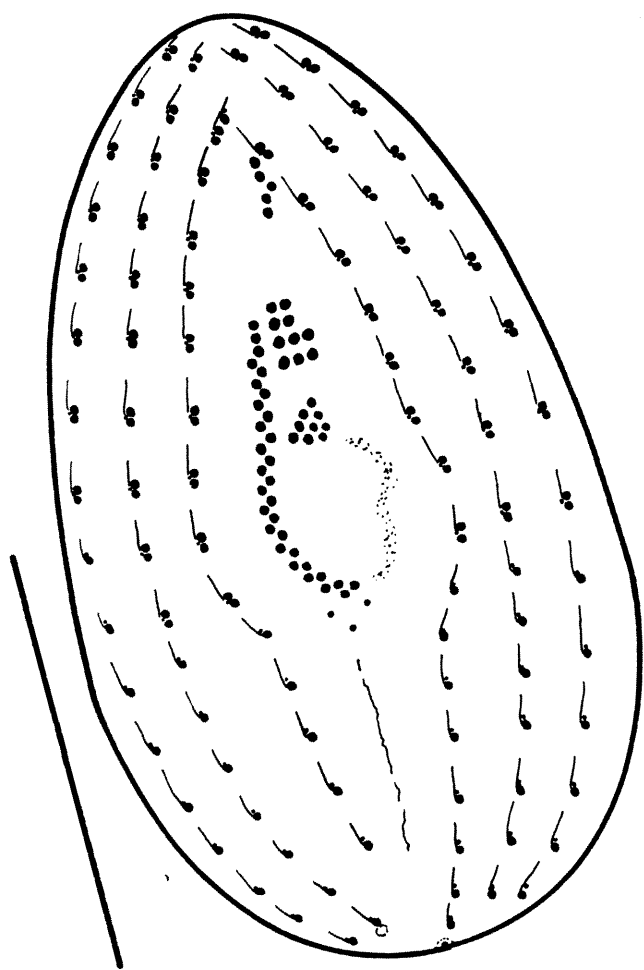


Figura 8.- Morfotipo 2: AD1, AE22, SRBM, scut2.1.

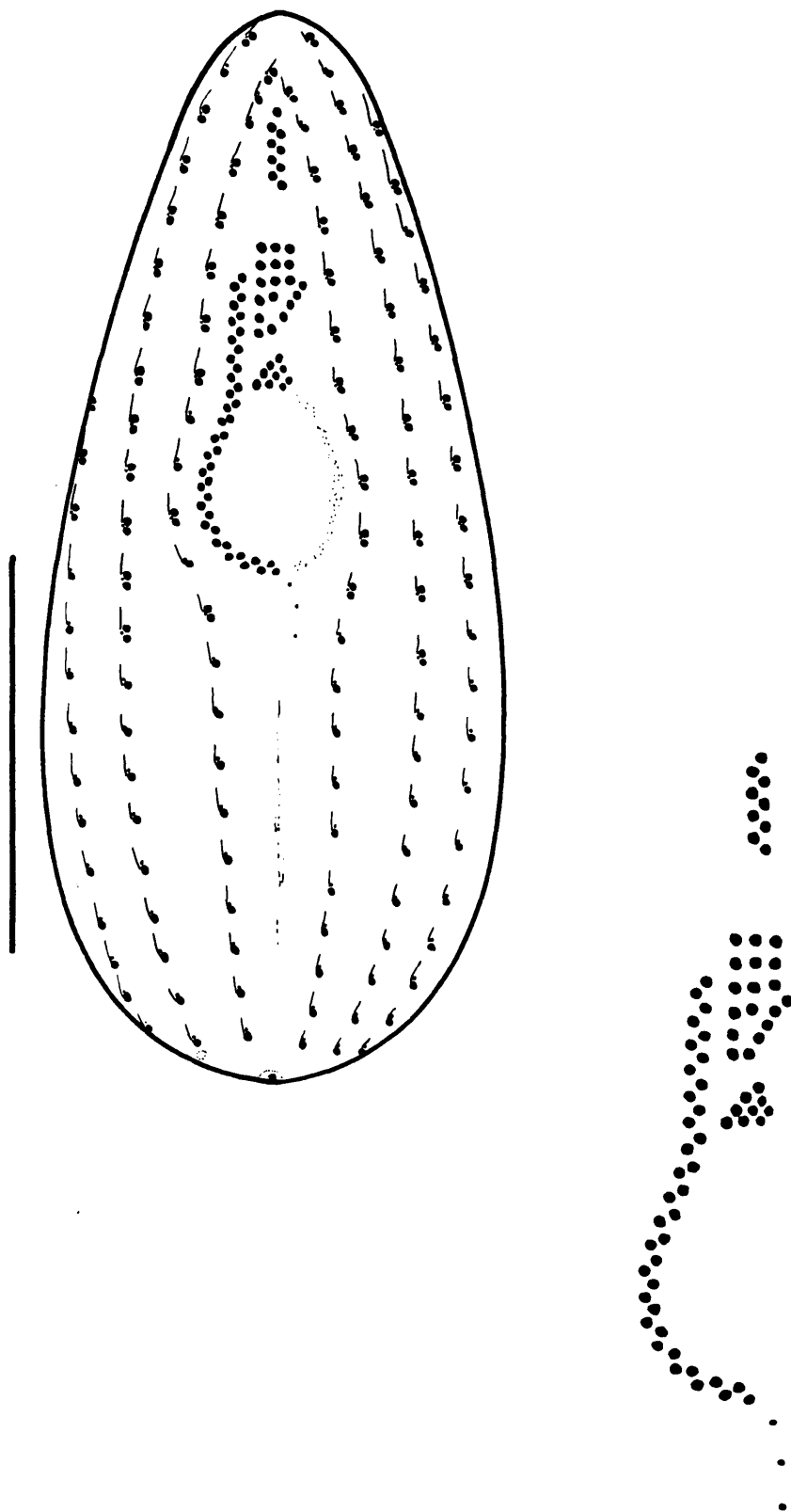


Figura 9.- Morfotipo 3: Parauronema acutum.

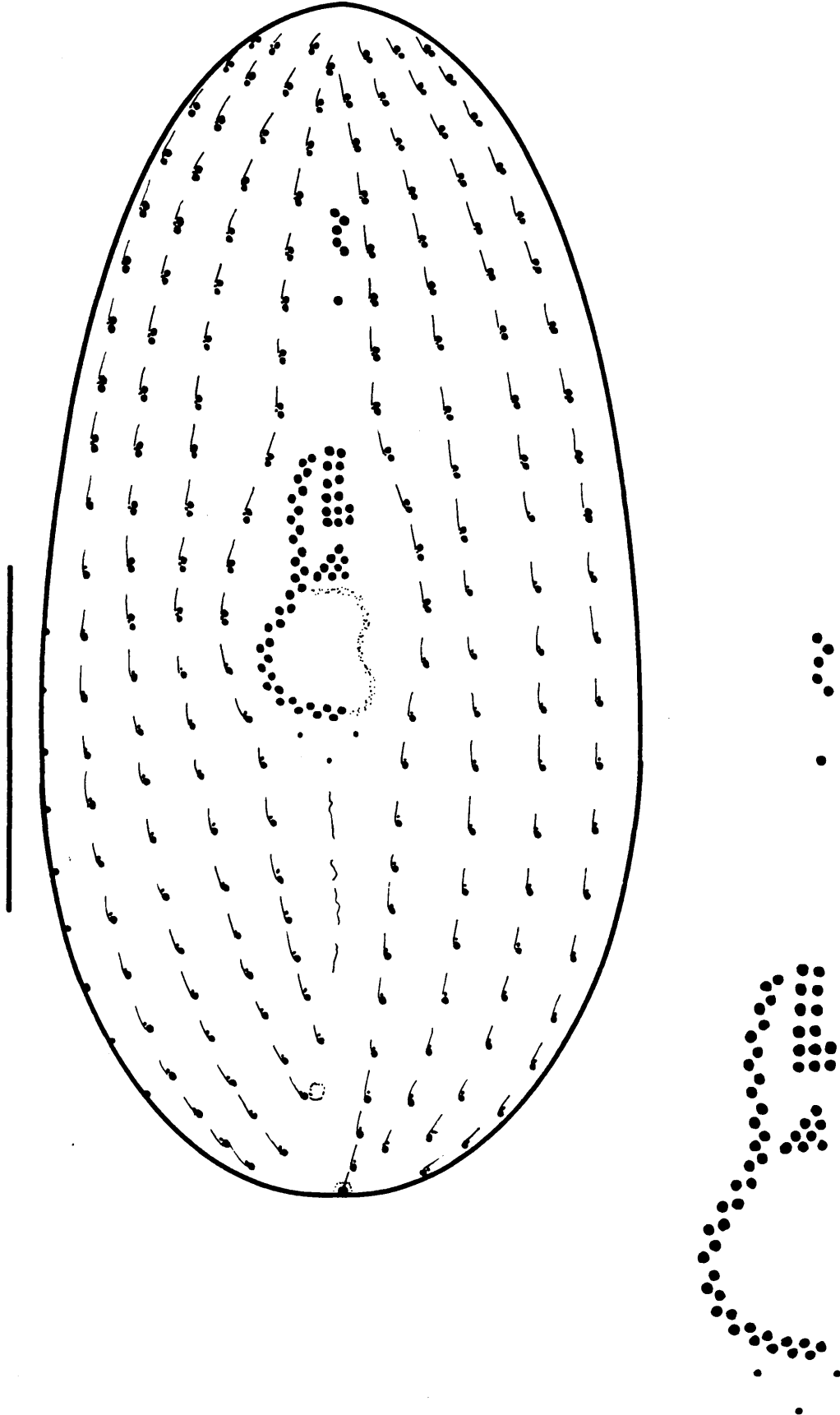


Figura 10.- Morfotipo 4: Cil3

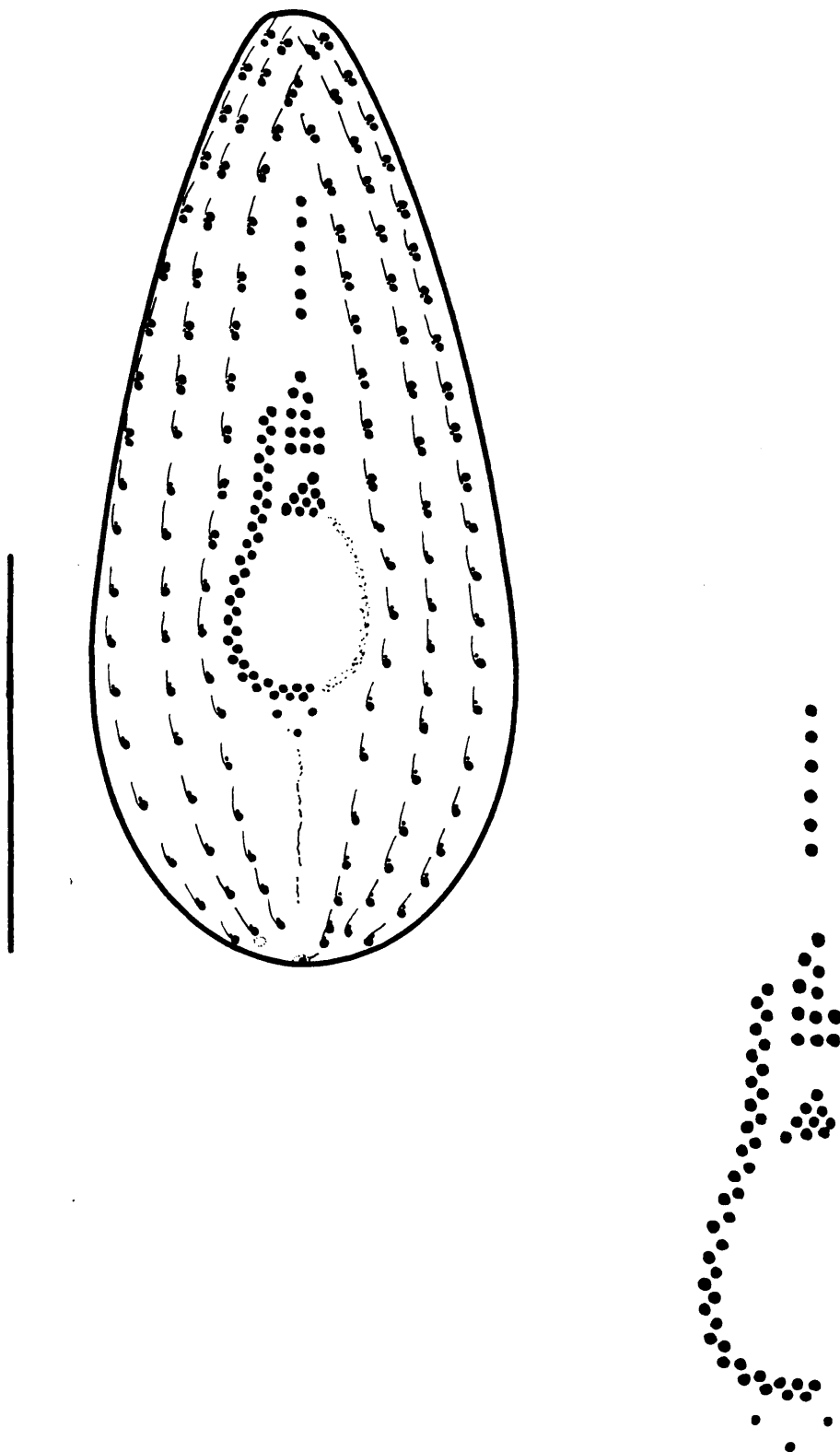


Figura 11.- Morfotipo 5: SWi1

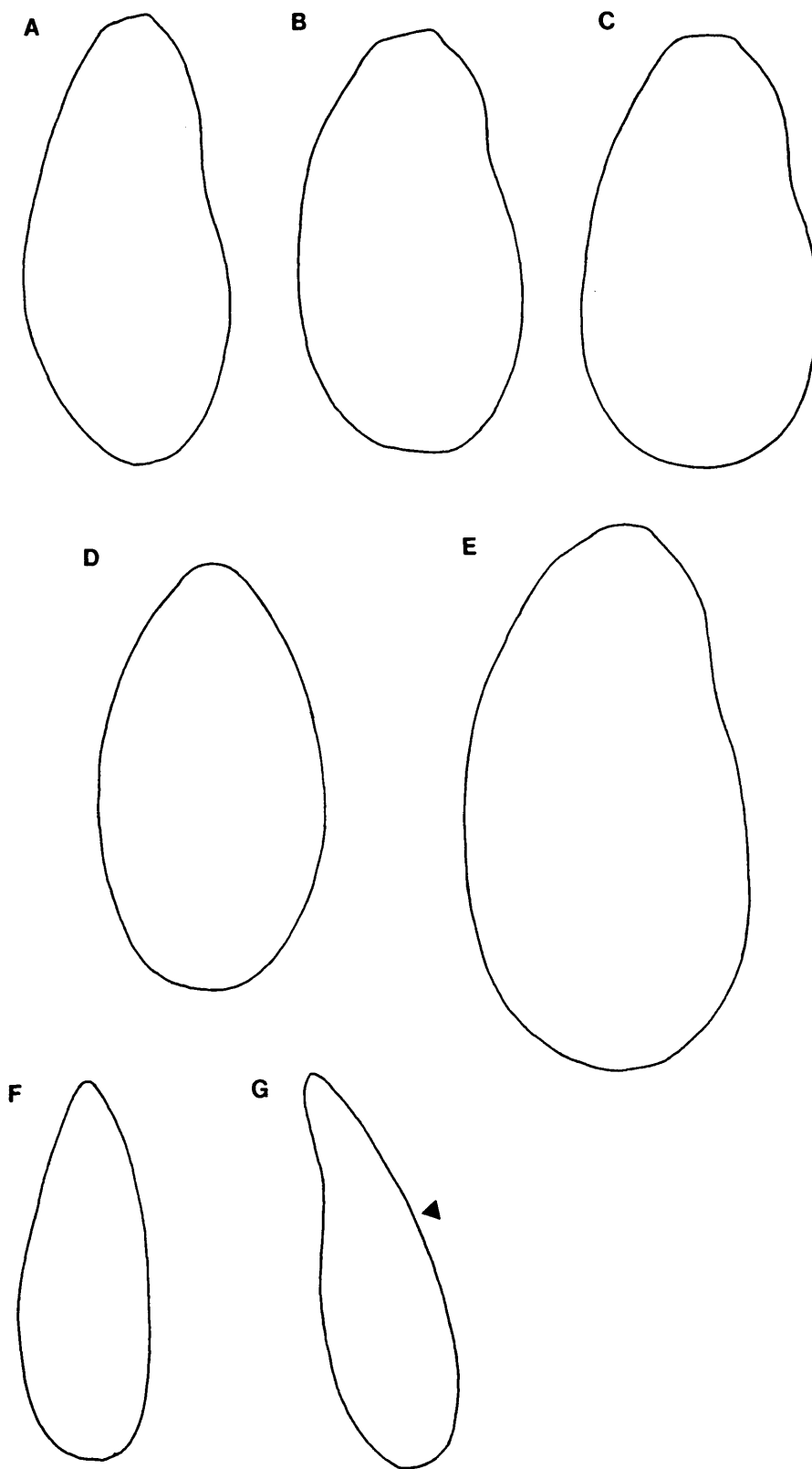


Figura 12.- Perfiles celulares en vivo de los distintos morfotipos. A.- Morfotipo 1 (AE21), B.- Morfotipo 2 (SCut 2.1), C.- Morfotipo 2 (AE22), D.- Morfotipo 5 (SW11), E.- Morfotipo 4 (Cil3), F.- Morfotipo 3, vista ventral (P. acutum), G.- Morfotipo 3, vista lateral (P. acutum)

Esta especie, obtenida directamente de la colección de cultivo de la FBA (CCAP)¹ fue aislada por el Dr. P.H. Burkill entre Enero 1974 y Enero del 1975 de una zona situada al sureste de la Bahía de Southampton conocida como Calshot Lightfloat. Esta especie, como ya se ha indicado, venía siendo cultivada en la FBA en cultivo mixto y fue clonada y mantenida en el laboratorio en cultivo monoxénico sobre la estirpe *Vibrio natriegens* (NCIMB#857).

Microscopía óptica

Las células en vivo se mueven muy rápido en trayectoria rectilínea, rotando a lo largo de su eje mayor, cambiando únicamente de trayectoria cuando tropiezan con un obstáculo. Sin embargo, suelen parar y se mantienen en esta posición estática durante largo rato cuando están alimentándose, moviendo únicamente los cilios del área bucal, produciendo corrientes que atraen a las presas hacia el área donde se producirán la invaginaciones y formación de las vacuolas alimenticias. La vacuola contráctil situada posteriormente en la célula es visible también en las células en vivo.

La forma celular es muy típica, tanto en fase de crecimiento estacionaria como exponencial, con el extremo posterior celular redondeado con una zona libre de cilios y un único cilio caudal. El extremo anterior, asimismo libre de cilios, es aplastado e inclinado hacia el área dorsal celular (Figura 12). El área ventral a nivel del área bucal esta ligeramente deprimida. En células estáticas alrededor de la zona bucal se suele observar gran movilidad de los cilios, pertenecientes a las polícinetias 2 (M2) y 3 (M3) y a los cilios de la línea externa de la

¹ Culture Collection of Algae and Protozoa. Freshwater Biological Association. Windermere. Inglaterra.

haplocinetia.

Infraciliación somática

La infraciliación somática está formada por diez cinetias meridianas. A veces pueden aparecer células con una cinetia más o menos (nueve u once cinetias respectivamente) pero con una frecuencia muy baja (Figura 13).

Las cinetias somáticas delimitan anteriormente un casquete libre de cilios. Este casquete está inclinado hacia la parte dorsal celular. La primera y la última cinetias somáticas no alcanzan éste círculo anterior, quedando un par y dos pares de posiciones cinetosómicas respectivamente debajo de él (Lámina 2d,2j). Asimismo, posteriormente, todas las cinetias terminan al mismo nivel delimitando otra área libre de cinetosomas, excepto la última cinetia que termina un cinetosoma más abajo que el resto de las cinetias, quedando más cerca del complejo basal del cilio caudal.

Todas las cinetias somáticas están compuestas por pares de cinetosomas en la mitad celular anterior y sencillos en la posterior, siendo aproximadamente la mitad de las posiciones cinetosómicas pares y la otra mitad sencillas, aunque las posiciones cinetosómicas están más comprimidas anteriormente que posteriormente. Aunque esta situación es general, en algunos ejemplares se han observado cinetias que pueden ser dicinetias completas, o en otros casos pueden aparecer cinetosomas sencillos intercalados entre pares en la parte anterior celular.

La primera cinetia presenta anteriormente un cinetosoma sencillo seguido estrechamente por un par de cinetosomas (Lámina 2 a, b, d). Estos (un cinetosoma + un par) quedan aproximadamente al mismo nivel de la segunda posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas.

El primer par de cinetosomas de la parte anterior de la ultima cinetia queda, sin embargo, a nivel de la tercera posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas, y de la segunda posición cinetosómica (segundo par de cinetosomas) de la primera cinetia somática (Lámina 2 c, d, g, j). Esta situación se va a repetir frecuentemente en algunos de los otros clones estudiados, siendo una característica morfológica estable.

Las distintas posiciones cinetosómicas presentan una fibra cinetodésmica claramente visible en el caso de la impregnación con carbonato de plata amoniacal, que se originan a nivel del cinetosoma posterior (en el caso de pares anteriores) y a su izquierda quedando dirigidas hacia la parte anterior celular (Lámina 2 a, b, c, d). Estas fibras pueden quedar superpuestas en algunos casos al estar las posiciones cinetosómicas más próximas entre sí. Son visibles asimismo, sacos parasómicos que quedan situados a la izquierda entre los pares de cinetosomas anteriores o anteriormente y ligeramente a la izquierda en el caso de cinetosomas sencillos.

El complejo basal del cilio caudal está formado por una estructura (en impregnación con carbonato de plata amoniacal) o tres estructuras (en impregnación con nitrato de plata, Lámina 2 j) que quedan delimitadas por una línea argentófila patente en algunos casos, desde el cual una fibra cinetodésmica queda dirigida hacia la ultima cinetia.

El número medio de cinetosomas por cinetia se puede observar y su distribución en ambas fases de crecimiento para todas las cinetias o exclusivamente la primera, ultima u otras se puede observar en la Figura 13.

Infraciliación bucal

El área bucal se encuentra situada en la región ecuatorial celular entre las cinetias primera y última

(Lámina 2 b, d), y hacia la región anterior celular.

Las estructuras bucales están constituídas por tres policinetias situadas en línea sobre el citostoma y una haplocinetia situada a la derecha del mismo.

La policinetia 1 o M1 está formada por una línea de cuatro o cinco cinetosomas no ciliados, situada a nivel de la tercera posición cinetosómica de la última cinetia (tercer par), comienza aproximadamente a nivel de la segunda posición cinetosómica de la última cinetia y llega casi hasta la cuarta (Lámina 2 a, b, c, d, f, g; Figura 7). La tinción de carbonato de plata rindió frecuentemente la presencia de cinco cinetosomas en una línea mientras que la de nitrato de plata presentó frecuentemente sólo cuatro. Sin embargo, tanto con la impregnación de carbonato de plata como con la de nitrato de plata se pueden observar otras dos manchas laterales a la línea de cinetosomas que podrían ser dos sacos parasómicos, aunque este extremo no se pudo comprobar.

La policinetia 2 o M2 está compuesta por tres líneas de seis, seis y cuatro cinetosomas (la más externa) respectivamente (Lámina 2 d, e; Figura 7). En el caso de la impregnación con nitrato de plata esta policinetia presenta forma trapezoidal y fue imposible distinguir cinetosomas sencillos en esta (Lámina 2 f, g). Se sitúa a nivel de las posiciones cinetosómicas 6 y 7 de la última cinetia.

La policinetia 3 o M3 está compuesta por nueve cinetosomas dispuestos en tres líneas oblicuas (con respecto a la haplocinetia) de cuatro, tres y dos cinetosomas cada una (Lámina 2 e; Figura 7). Esta disposición es la más frecuente y se observó consistentemente en el resto de los clones de la misma manera. Esta policinetia está situada justo a nivel del límite entre las regiones A y B de la haplocinetia. En el caso de la impregnación con nitrato de plata esta

policinetia tiene forma triangular oligeramente romboidal. Como en el caso de M2, fue imposible distinguir cinetosomas sencillos. Se sitúa a nivel de las posiciones cinetosómicas septima y octava de la ultima cinetia somática (Lámina 2 f, g).

La haplocinetia presenta forma de interrogación y está constituida por dos líneas de cinetosomas dispuestos en zig-zag. Frecuentemente se observó una tercera línea de estructuras, en el caso de la tinción con carbonato de plata, de la cual se hablará más adelante en el estudio de microscopía electrónica de transmisión, que resultó ser una linea externa de sacos parasómicos. La haplocinetia presenta tres segmentos A, B y C. El segmento A de dicha haplocinetia comienza anteriormente apróximadamente a nivel de la mitad de la M2 (Lámina 2 c, f, g). La composición de esta estructura se observó como una línea en el caso de la impregnación con nitrato de plata, sobre la que no se pudieron distinguir cinetosomas, sin embargo con la impregnacion con carbonato de plata amoniacal, este segmento se observó constituido por ocho cinetosomas.

El segmento B, que corresponde con la parte curva de la haplocinetia está constituido por once o doce cinetosomas. Esta observación sólo se pudo llevar a cabo por medio de la impregnación con carbonato de plata amoniacal.

El segmento C de la haplocinetia - vestigio del escutico - fue muy difícil de observar en la impregnación de carbonato de plata amoniacal, siendo casi únicamente perceptible en aquellos casos en el que el proceso de división ya había comenzado con la proliferación de cinetosomas de dicha estructura. Sin embargo, su composición parece ser de tres cinetosomas formando un triángulo invertido justo debajo del final del segmento B de la haplocinetia. La impregnación con nitrato de plata rindió mejores resultados haciendo más claramente visible dicha estructura, que apareció compuesta por tres

cinetosomas dispuestos como en los vértices de un triángulo invertido. Los cinetosomas quedaron siempre unidos por líneas argentófilas patentes que se continuaban posteriormente hasta la región del citopigio y anteriormente por un lado hacia la haplocinetia y por otro rodeando ampliamente el área del citostoma (Lámina 2 f, g). En esta ultima parte del recorrido de esta línea argentófila aparecieron frecuentemente dos manchas argentófilas también, que fueron consistentes en la mayoría de las células observadas cuya identidad no ha podido esclarecerse pero que pueden ser sacos parasómicos o mucocistos (Lámina 2 f, g). Los cinetosomas que componen este escutico no son ciliados, sin embargo parecen serlo durante el proceso de estomatogénesis.

Aparato nuclear

El macronúcleo de forma redondeada u ovalada y regular está situado centralmente a nivel ecuatorial en la célula, durante la fase estacionaria de crecimiento (Lámina 2 b, c). En la fase exponencial de crecimiento está ligeramente desviado sobre el plano ecuatorial llegando incluso hasta el extremo anterior celular. Esta situación es provocada por la aparición de numerosas vacuolas alimenticias en esta fase.

El micronucleo no se observó en ninguna de las dos fases de crecimiento estudiadas. Sin embargo, algunas veces si fue observada una pequeña estructura del mismo aspecto del material nuclear con la impregnación de carbonato de plata amoniacoal aproximadamente de 1 μ m de tamaño, pero no se observó en todas las células.

El citopigio, situado bajo el segmento C de la haplocinetia entre las cinetias primera y última, que no se pudo observar claramente con la impregnación con carbonato de plata, si apareció sin embargo con la impregnación con nitrato de plata, como una línea que

conectaba uno de los cinetosomas que forman parte del vestigio del escutico hacia la parte posterior celular con la primera cinetia somática (Lámina 2 f, g, j).

El poro de la vacuola contráctil queda situado al final de la segunda cinetia somática (Lámina 2 a).

Microscopía electrónica de barrido

El estudio con microscopía electrónica de barrido permitió la observación externa de la ciliación somática del ciliado y de las estructuras bucales.

La densa ciliación en la parte anterior celular por la presencia de cinetosomas dobles, ambos ciliados como ya se ha explicado en el apartado anterior (Lámina 3 a, b), dificultó la observación de otras estructuras. Sin embargo, se pudo observar claramente la presencia de los cilios pertenecientes a las polycinetia 2 y a la 3. Los cilios pertenecientes a la polycinetia 2 quedan en disposición perpendicular a la superficie celular, mientras que los cilios pertenecientes a la polycinetia 3, que son ligeramente más cortos que los de la 2, quedan dirigidos hacia la depresión que se forma en el área del citostoma, por lo tanto están dispuestos prácticamente paralelos a la superficie celular (Lámina 3 a, b).

La haplocinetia presenta cilios en la línea de cinetosomas más externa de dicha estructura (Lámina 3 a, b), apareciendo los primeros cilios anteriores (segmento A de la haplocinetia) a nivel de la parte media de la polycinetia 2 de la que queda separada por una cresta intermembranal de la que se hablará más adelante. El segmento A está constituido por cinco o seis cilios, mientras que el segmento B presenta de once a trece cilios.

Se pudieron observar, asimismo, la situación del poro de la vacuola contráctil (Lámina 3 d) y las estrías

peliculares en la superficie celular que coinciden exactamente con la situación de las líneas argentófilas observadas por medio de la impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff) y a veces con carbonato de plata amoniacal. Estas líneas se observan bajo la haplocinetia (Lámina 3 a, b), exactamente en la situación del segmento C de la haplocinetia, como ya se observó en el caso de la impregnación con nitrato de plata (Lámina 2 f, g), donde se situa el vestigio del escutico, continuandose con el citopigio y conectando con la parte posterior de las cinetias somáticas (hacia la primera cinetia somática) (Lámina 3 c, d).

El vestigio del escutico al no ser ciliado excepto en aquéllas células en proceso de estomatogénesis, no se pudo observar como tal, sin embargo en el área exactamente bajo el final del segmento B de la haplocinetia, aparecen regularmente tres poros (Lámina 3 c), situados exactamente en forma de triángulo invertido y conectados con estrias observables superficialmente de la misma manera que se observó con la utilización de impregnaciones, lo que hace pensar que en el caso de la tinción con nitrato de plata la observación de dicha estructura se haga patente simplemente por deposición de plata en dichos poros y no por impregnación de bases ciliares.

Se observó la presencia muy típica y constante de crestas o repliegues de membrana entre la posiciones de la policinetia 1 y a ambos lados de la 2 (Lámina 3 a, b). Estas estructuras parecen formar una "Y" invertida sobre el área de las policinetias 1 y 2 (M1 y M2). Tres de estas crestas aparecen en la zona donde debe estar situada la policinetia 1 (no ciliada), donde dos de estas, que son de mayor tamaño, aparecen en línea y un repliegue menor entre aquéllas y a su izquierda. Más abajo y a ambos lados de la policinetia 2 (M2), aparecen otras dos crestas, una entre la haplocinetia y la propia policinetia 2 (M2) y otra a la derecha de ella (externamente), ambas parecen ser de una longitud similar a la propia policinetia (Lámina 3 a, b).

Otra cresta pero mucho más reducida parece situarse bordeando externamente a la haplocinetia.

Microscopía electrónica de transmisión

El examen de secciones ultrafinas por medio de microscopía de transmisión permitió la determinación correcta de la composición a nivel ultraestructural de la infraciliación somática y bucal, así como de otras estructuras corticales. Se intentaron localizar igualmente las estructuras que se correspondiesen con crestas o repliegues entre las estructuras bucales observadas con microscopía electrónica de barrido.

Lo primero que llama la atención es la presencia de las mitocondrias gigantes (Mt) de crestas tubulares que forman parte del condrioma. Estas ocupan la mayor parte del citoplasma debajo de la película y se sitúan en los espacios entre cinetias recorriendo la longitud completa del ciliado (Lámina 4 a, b). Sorprendentemente, estas no se observaron por medio de las impregnaciones con carbonato de plata amoniacoal como se han observado en otros estudios en Uronema (Téllez, 1980).

El estudio de secciones tangenciales y transversas de la película celular mostró la composición ultraestructural de las cinetias somáticas que se pudieron observar tanto en zonas anteriores celulares de cinetosomas dobles como en áreas posteriores de cinetosomas sencillos, rodeadas como ya se ha indicado por el condrioma (Lámina 4 a, b). Se pueden observar los cinetosomas y algunas de las fibras asociadas, como las fibras cinetodésmicas, las bandas de microtúbulos o fibras postciliares y transversas, ambas compuestas por cuatro microtúbulos. Los pares de cinetosomas anteriores presentan un saco parasómico asociado que queda situado entre ellos y a su izquierda, sobre la posición de la fibra cinetodésmica que se dirige hacia adelante y queda también a la izquierda de los

cinetosomas (Lámina 4 a). Los cinetosomas sencillos presentan el saco parasómico situado anteriormente al cinetosoma y ligeramente desviado a la izquierda. Los cortes longitudinales y transversales permitieron observar los numerosos mucocistos (Lámina 4 c) situados normalmente entre posiciones cinetosómicas contiguas o entre cinetias. Suelen quedar impregnados con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff) o con protargol, haciendo difícil en algunos casos la identificación de otras estructuras.

La composición de la polycineta 2 (M2) se pudo observar parcialmente en varios cortes. Su composición cinetosómica correcta es de tres líneas de seis, seis y cinco cinetosomas respectivamente (Lámina 5 a, c, d). Aparecen, además, varios sacos parasómicos dispuestos irregularmente entre los cinetosomas lo que puede inducir a errores en el caso de la utilización de las impregnaciones, ya que estos quedan teñidos también.

La composición de la polycineta 3 (M3), que en las impregnaciones fue muy difícil de determinar, parece presentar un cinetosoma más que los observados en el caso de las impregnaciones; está compuesta por una línea de cuatro cinetosomas, una de tres, una de dos y un cinetosoma en el extremo (Lámina 5 a, b). Su posición no es paralela a la superficie como ocurre con la polycineta 2 (M2), sino que queda inclinada hacia el interior celular en la hendidura del citostoma (Lámina 5 c, e), forzando a los cilios que porta a cubrir dicha área, situación que concuerda con la observada en el estudio con microscopía electrónica de barrido. Esta podría ser una de las causas de la dificultad para su observación por medio de impregnaciones, incluso con carbonato de plata amoniacal.

La haplocinetia se puede observar en varios de sus tramos en la Lámina 5 (b, d y e). Está constituida por una línea de cinetosomas dobles dispuestos en zig-zag de la que sólo la línea externa de cinetosomas es ciliada. Externamente a esta línea de cinetosomas existe una línea

de sacos parasómicos que parece corresponderse con la línea externa que se observó impregnada con la técnica de carbonato de plata amoniacoal. La línea interna de cinetosomas, no ciliada, presenta una línea de fibras postciliares (Lámina 5 b).

Se pudieron observar asimismo, repliegues de membrana o crestas situadas externamente a la haplocinetia y entre la haplocinetia y la policinetia M2. Parecen corresponderse con algunos de los repliegues observados en el área bucal por medio de microscopía electrónica de barrido (Lámina 3 a, c). La cresta que queda entre la policinetia 2 (M2) y la haplocinetia parece continuarse hacia la policinetia 3 (M3) (Lámina 5 c).

El aparato nuclear del que como en el caso de la utilización de impregnaciones argénticas sólo se pudo observar el macronúcleo, presentó como se ha observado en otros estudios sobre escuticociliados (Kaneshiro, E. y Holz, G.G.J., 1976) nucleolos granulares en la perifería y cuerpos cromatínicos dispersos. No se observó el micronúcleo.

Los cortes transversos de la zona del citostoma muestran la única membrana unitaria que nos permite diferenciar el límite entre este y la película celular que además del plasmalema y las dos membranas alveolares. Aparecen numerosas vesículas discoidales. Estas vesículas, observadas en otros trabajos con microscopía electrónica sobre escuticociliados (Puytorac, P.d. y col., 1974; Kaneshiro and Holz, 1976) parece tener alguna función en la regeneración de la membrana de las vacuolas alimenticias (Lámina 5e) (Allen, R.D., 1974; Kloetzel, J.A., 1974).

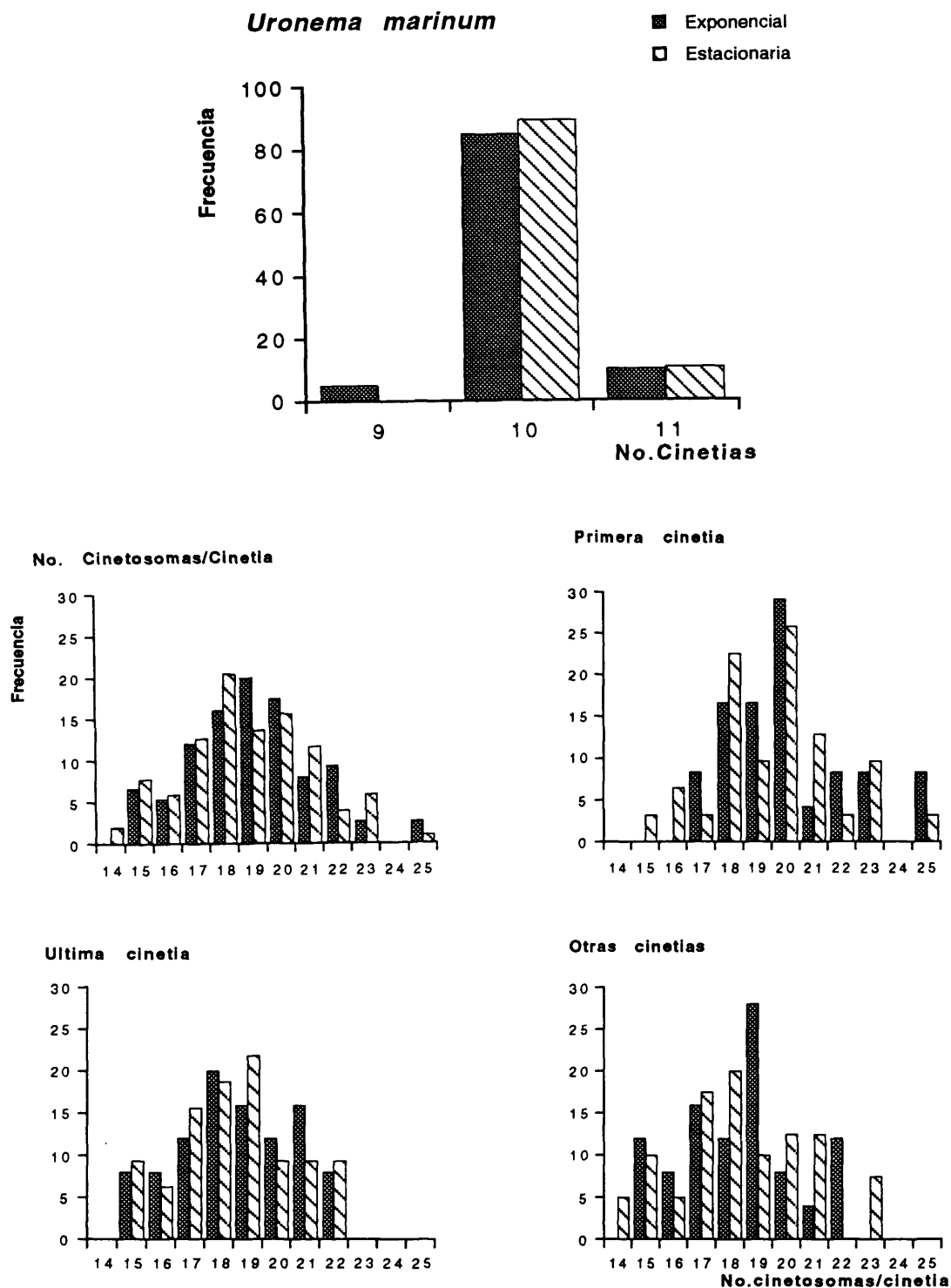


Figura 13.- Distribución por frecuencias del número de cinetias somáticas y el número de cinetosomas por cinetia (a.- en total, b.- en la primera cinetia, c.- en la última cinetia d.- en otras cinetias) en *U.marinum* en ambas fases de crecimiento.

Esta especie se obtuvo también de la colección de cultivo de la FBA (CCAP)², fue clonada y mantenida en cultivo monoxénico con *Vibrio natriegens* (NCIMB#857) en nuestro laboratorio.

Microscopía óptica

El comportamiento de las células *in vivo* de esta especie fue similar al descrito para Uronema marinum, así como la forma celular en ambas fases de crecimiento. La única diferencia aparente entre ambas fue que esta parecía ser ligeramente más grande.

Infraciliación somática

El número de cinetias somáticas en este clon fue de doce en ambas fases, aunque se encontraron células entre once y catorce cinetias, en número variable dependiendo de la fase de crecimiento. La distribución en el número de cinetias para ambas fases de crecimiento se exponen en las Figura 14.

Las posiciones relativas de las cinetias fueron similares a las descritas para Uronema marinum. Todas las cinetias somáticas, excepto la primera y la última, delimitan anteriormente un círculo no ciliado (Lámina 6 a). La primera cinetia no comienza exactamente en el círculo anterior sino un poco más abajo, casi a nivel de la segunda posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas, presentando un cinetosoma sencillo seguido estrechamente por un par de cinetosomas, como se ha descrito para Uronema marinum. Asimismo, la última cinetia comienza anteriormente

² Culture Collection of Algae and Protozoa. Freshwater Biological Association. Windermere. Inglaterra.

al mismo nivel de la tercera posición cinetosómica del resto de las cinetias y de la segunda posición cinetosómica de la primera cinetia somática (Lámina 6 a, b; Figura 7).

Posteriormente las cinetias delimitan otro círculo no ciliado, excepto por la presencia del complejo basal del cilio caudal. La última cinetia es en este caso la excepción ya que suele ser un cinetosoma más larga que el resto, quedando más cerca del complejo basal del cilio caudal, desde el cual una fibra cinetodésmica se dirige hacia ella.

El complejo basal del cilio caudal se observó como tres estructuras argentófilas dispuestas formando un triángulo.

El número de cinetosomas por cinetia, varía entre diez y veintisiete en fase exponencial de crecimiento y entre once y veintidos en fase estacionaria, como se puede observar en la Figura 14 y Tabla 25.

Infraciliación bucal

La polycinetia 1 o M1 es una línea sencilla de cuatro o cinco cinetosomas no ciliados situada frente a la tercera y cuarta posiciones cinetosómicas de la última cinetia, de la que queda muy cerca (Lámina 6 a, b, d). A veces, como se observó en Uronema marinum, la parte central (derecha) de la polycinetia, aparecía engrosada, por la presencia de otras dos estructuras argentófilas observables como dos puntos laterales similares a cinetosomas que podrían ser sacos parasómicos, ya que sólo se pudieron observar en el caso de la impregnación con carbonato de plata pero no con nitrato de plata.

La polycinetia 2 o M2 está compuesta por tres líneas de cinetosomas de las que las dos internas (más cercanas a la haplocinetia) son de cinco cinetosomas mientras que

la externa es de tres cinetosomas. Como en el caso de Uronema marinum la forma de esta polycineta con nitrato de plata tiende a ser triangular o trapezoidal.

La polycineta 3 o M3 es muy pequeña y difícil de observar pero se distinguen al menos tres líneas de cinetosomas en ella de cuatro, tres y dos cinetosomas respectivamente, situados oblicuamente quedando un cinetosoma en el extremo (Figura 7)

La haplocinetia, en el caso de la impregnación con carbonato de plata, se observó compuesta por dos líneas cinetosómicas en el segmento A, mientras que en el segmento B se observaron tres líneas, quedando la tercera línea como en una posición más externa que queda en un plano diferente a las otras dos. Como ya se indicó en el estudio en U. marinum, esta tercera línea se corresponde con una línea externa de sacos parasómicos. En el caso de la impregnación con nitrato de plata, no fue posible distinguir ninguna de las líneas de cinetosomas observadas con carbonato de plata amoniacal.

El segmento C de la haplocinetia o vestigio del escutico como en el caso de U. marinum está compuesto por tres estructuras cinetosómicas dispuestas en los vértices de un triángulo invertido (Lámina 6 d).

Aparato nuclear

El macronúcleo es oval o redondeado y suele estar en posición central y ecuatorial justo debajo de M2, M3 y parte de la haplocinetia, lo que hace bastante difícil la observación de estas estructuras en la célula en fase de crecimiento estacionaria. En el caso de la fase exponencial el macronúcleo es oval y está desviado a la parte anterior celular por las abundantes vacuolas digestivas presentes en el citoplasma.

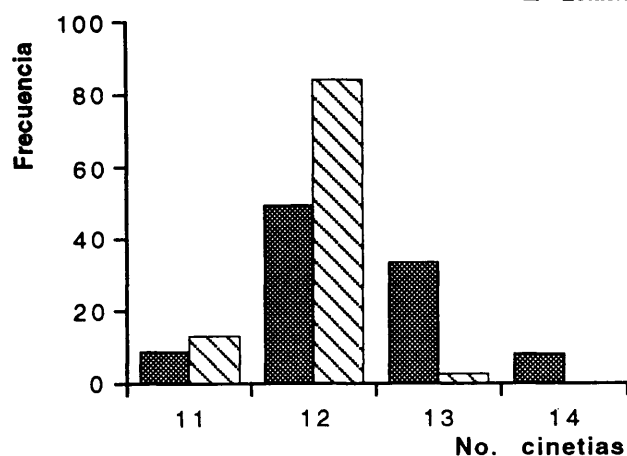
El micronúcleo no se observó en ninguna de las dos fases, como ocurrió en el caso de Uronema marinum.

El citopigio situado bajo el segmento C de la haplocinetia se continúa hacia el polo posterior celular, como una línea argentófila observable únicamente por medio de la impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff).

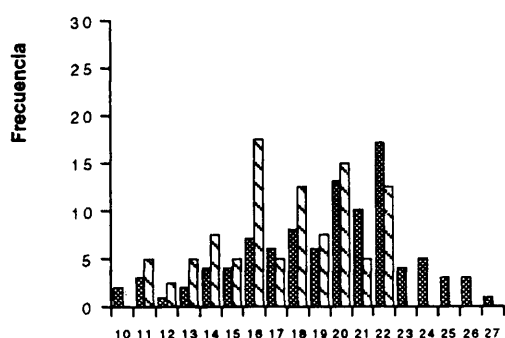
El poro de la vacuola contráctil está situado al final de la segunda cinetia somática.

Uronema schewiakoffi

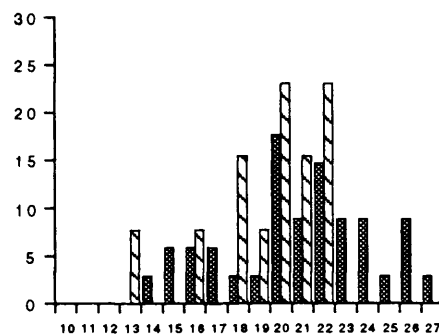
■ Exponencial
▨ Estacionaria



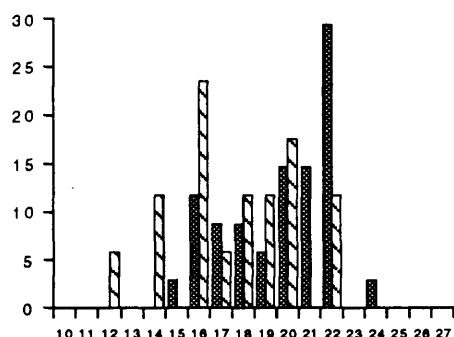
No. cinetosomas/cinetia



Primera cinetia



Ultima cinetia



Otras cinetias

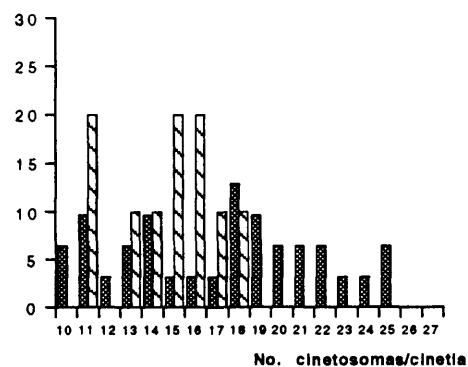


Figura 14.-

Distribución por frecuencias del número de cinetias somáticas y el número de cinetosomas por cinetia (a.- en total, b.- en la primera cinetia, c.- en la última cinetia d.- en otras cinetias) en U.schewiakoffi en ambas fases de crecimiento.

Parauronema acutum obtenida en cultivo axénico de la FBA fue aislada por el Dr. A.T. Soldo y col. en la costa Sur de Florida (EEUU) (Soldo, A.T. y Merlin, E.J., 1972) se clonó y fue mantenida en cultivo monoxénico sobre *Vibrio natriegens* (NCIMB#857) en nuestro laboratorio.

Microscopía óptica

Las células vivas pertenecientes a este clon, a diferencia del resto de los clones aislados, son muy flexibles. La forma celular es redondeada posteriormente y acuminada hacia la región anterior, inclinada ligeramente hacia la región dorsal celular (Figura 12). Las células se mueven muy rápido en trayectoria lineal, rotando alrededor del eje mayor celular al mismo tiempo. Raramente se presentan en posición estática, excepto cuando chocan con alguna partícula en su trayectoria, para cambiar rápidamente de dirección, a diferencia de los demás clones aislados, lo cual es una de las más llamativas diferencias de comportamiento.

Otras estructuras visibles *in vivo*, son la presencia de una vacuola contráctil en la parte posterior celular y ligeramente ladeada, la presencia de un cilio caudal, y la observación de cilios muy largos presentes en el área bucal. Se puede observar asimismo, por medio de microscopía de interferencia, el área bucal como una especie de pequeña depresión.

Infraciliación somática

Este clon presenta once cinetias, tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de crecimiento. No se observaron células con mayor o menor número cinetias en ninguna de las dos fases (Figura 15).

Las cinetias somáticas están formadas por pares de cinetosomas ciliados que algunas veces se extienden hasta casi la mitad o el tercio posterior celular donde aparecen exclusivamente cinetosomas sencillos. Sin embargo, suelen aparecer cinetosomas sencillos en la zona anterior de las cinetias intercalados entre pares, por ejemplo en la primera cinetia anteriormente aparece un par de cinetosomas seguidos por dos cinetosomas sencillos y continuandose con pares de cinetosomas hasta apróximadamente el nivel del final del segmento A de la haplocinetia, donde suelen aparecer ya los cinetosomas sencillos (Lámina 7 a, c). En el resto de las cinetias, incluida la última, la segunda posición anteriormente suele estar ocupada por un cinetosoma sencillo.

Las posiciones relativas de la primera y última cinetias somáticas están claramente definidas en este clon. La primera y última cinetias no comienzan al mismo nivel que el resto de las cinetias, en la parte anterior de la célula. La primera cinetia queda un poco por debajo del círculo anterior formado por el resto de las cinetias somáticas (Lámina 7 d, f y 8 a, c), apróximadamente a nivel de la segunda posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas, mientras que el primer par de cinetosomas anteriores de la última cinetia quedan situados a nivel de la tercera posición de cinetosomas del resto de las cinetias somáticas (Lámina 7 d, f y 8 a; Figura 9). La última cinetia, asimismo, termina posteriormente al mismo nivel que el resto de las cinetias somáticas (Lámina???e; Figura 9). Las cinetias somáticas delimitan de esta forma dos círculos pequeños apical y posterior respectivamente (Lámina???f,g; Lámina??c), si se comparan con el resto de los clones estudiados.

El número de cinetosomas por cinetia suele oscilar entre dieciocho y veintinueve, dependiendo de la fase de crecimiento. Se observaron diferencias ligeras en el número de cinetosomas dependiendo de la cinetia. Por ejemplo, la primera y ultima cinetias parecen portar mayor número (o

posiciones cinetosómicas) que el resto de las cinetias, y la primera cinetia parece portar mayor número de cinetosomas que la última cinetia (Figura 15).

El argiroma observable con la impregnación con nitrato de plata deja ver líneas transversales entre cinetias entre las posiciones cinetosómicas dos y tres y a nivel de la sexta posición cinetosómica (Lámina 8 d, g).

Infraciliación bucal

La policinetia 1 o M1 está compuesta por dos líneas asimétricas de cuatro y cinco cinetosomas respectivamente, parte de esta policinetia es ciliada como se puede observar en la Lámina 7 a, portando cilios bastante largos. Esta policinetia está situada bastante arriba en la célula, y su situación es justo en frente de la primera y tercera posiciones cinetosómicas de la última cinetia somática (Lámina 7 a, c y 8 c, d).

La policinetia 2 o M2 está formada por tres filas de cinetosomas que terminan a diferentes niveles, presentando una forma peculiar posteriormente (Lámina 7 c, d y 8 a, c; Figura 9). La línea más larga es la adyacente a la haplocinetia y la más corta es la más alejada de ella. La forma observable por esta razón en la impregnación con nitrato de plata es ligeramente irregular, siendo más ancha anteriormente que posteriormente.

La policinetia 3 o M3 observada en nitrato de plata es de forma triangular. En el caso de la tinción con carbonato de plata esta forma triangular parece estar formada por ocho cinetosomas cuya disposición se muestra en la Figura 9. Esta policinetia queda muy cercana a la haplocinetia de tal manera que algunas veces parece continuarse con ella (Lámina 7 c).

La haplocinetia está formada por dos líneas de

cinetosomas dispuestas en zig-zag y una tercera línea claramente observable con la impregnación de carbonato de plata que en un principio no se pudo identificar y de la que se hablará más adelante en microscopía electrónica (Lámina 7 c). La haplocinetia paroral está compuesta de dos líneas de cinetosomas de aproximadamente dieciocho cinetosomas cada una, de siete en el segmento A y once en B, dispuestas en zig-zag, de las cuales sólo la exterior es ciliada.

El segmento C de la haplocinetia en este caso está formado por tres cinetosomas en línea que comienzan justo debajo del final del segmento B de la haplocinetia (Lámina 7 c). Estos están situados sobre una línea argentófila que se continúa con el citopigio y de éste hacia el polo posterior celular (Lámina 8 c, d, e) visible con la impregnación de nitrato de plata.

Aparato nuclear

El macronúcleo es de forma oval o redondeada y está situado sobre el plano ecuatorial, debajo de M3 y parte de M2, cuando se observa a las células ventralmente en fase estacionaria de crecimiento. En fase exponencial de crecimiento suele estar desplazado a la zona anterior celular.

El micronúcleo no se observó en ninguna de las células estudiadas y en ninguna de las dos fases, aunque a veces en fase estacionaria se observó un punto de material nuclear como saliendo lateralmente del macronúcleo, que parecía estar incluido en la membrana nuclear y podría ser un micronúcleo.

El poro de la vacuola contráctil, observado tanto con la técnica de carbonato de plata amoniacal como con la de nitrato de plata, está situado en el extremo posterior de la segunda cinetia somática, justo debajo del último

cinetosoma. A veces se observaron dos poros muy juntos.

El citopigio está situado entre la primera y última cinetias bajo el segmento C de la haplocinetia (Lámina 8 c).

Las bacterias endosimbiontes presentes en el citoplasma de este ciliado se tiñeron fuertemente con carbonato de plata (Láminas 7 a, b, c, d y 8 a, b), incluso en aquellos casos, como por ejemplo en fase exponencial en la que aparecieron muy claras el resto de las estructuras somáticas. Esta característica hizo bastante difícil la observación de la infraciliación en este ciliado por medio de esta impregnación.

Este clon produjo algunos resultados con la impregnación con protargol, siendo casi el único en el que se podían distinguir estructuras somáticas y bucales empleando dicho método (Lámina 8 h).

Microscopía electrónica de barrido

La observación detallada de las estructuras bucales en este clon se hizo difícil debido tanto a la presencia de dobles cilios somáticos en este área como a la forma anterior acuminada de estas células.

La ciliación somática (Lámina 9 a) es doble en la parte anterior y sencilla a partir de la región bucal hacia el área posterior de la célula. Se pueden observar abundantes estructuras a lo largo de la cinetia entre cilios adyacentes, que probablemente sean mucocistos, muy abundantes en estos ciliados y que podrían ser expulsados a lo largo del proceso de fijación y deshidratación.

La polycinetia 1 es claramente visible por la presencia muy aparente de los cilios que la componen que son muy largos, llegando prácticamente a la región del

citostoma, parece sin embargo que sólo una de las líneas de cinetosomas en esta policinetia son ciliados, ya que normalmente sólo son visibles cuatro cilios. Estos cilios, como ya se ha indicado anteriormente junto con los de las otras policinetias, fueron observados en vivo. Esta policinetia presenta dos crestas a su derecha (Lámina 9 a, b).

Los cilios pertenecientes a la policinetia 2 son ligeramente más cortos que los de la policinetia 1 y quedan en disposición perpendicular a la superficie celular. Los cilios pertenecientes a la policinetia 3, de la misma manera que se observó para U.marinum, son ligeramente más cortos que los de la 2 y quedan dirigidos hacia la depresión que se forma en el área del citostoma, por lo tanto están dispuestos prácticamente paralelos a la superficie celular (Lámina 9 a, b).

La haplocinetia esta constituída por una única línea de cilios pertenecientes a la línea de cinetosomas más externa de dicha estructura (Lámina 9 a, b), apareciendo los primeros cilios anteriores (segmento A de la haplocinetia) a nivel casi de la parte posterior de la policinetia 2 de la que queda separada por una cresta. El segmento A está constituído por cinco o seis cilios, mientras que el segmento B presenta de diez a once cilios.

El poro de la vacuola contráctil está situado debajo del último cinetosoma de la segunda cinetia somática (Lámina 9 d). Las estrías peliculares en la superficie celular bajo la haplocinetia (Lámina 9 a), coinciden de nuevo con la situación de las líneas argentófilas observadas por medio de la impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff) y a veces con carbonato de plata amoniacal. Estas líneas argentófilas delimitan, asimismo, el área del citopigio, cuya situación en esta especie parece ser más anterior que en el caso de U.marinum.

El área del segmento C de la haplocinetia o vestigio del escutico presenta regularmente tres poros (Lámina 9 e), situados en línea y conectados con estrías observables superficialmente de la misma manera que se observó con la utilización de impregnaciones (Lámina 9 c). El último de estos poros está situado casi a nivel de la zona del citopigio.

Las crestas o repliegues de membrana se observaron de nuevo en este clon de manera regular y constante como para U. marinum. Éstas se sitúan dos a la derecha de la policinetia 1, una entre la haplocinetia y la policinetia 2 y otra a la derecha de ésta, respectivamente (Lámina 9 a, b). Estas estructuras se disponen forma una "Y" invertida sobre el área de las policinetias 1 y 2, como en U. marinum.

La Lámina 9 c muestra el pequeño tamaño del casquete anterior celular que queda delimitado por las cinetias somáticas. Éste es de forma acuminada y queda ligeramente inclinado hacia la región dorsal celular. La Lámina 9 d muestra el área de inserción del cilio caudal, se puede observar en éste y a la izquierda de algunas de las inserciones ciliares los poros pertenecientes a los sacos parasómicos acompañantes. El tamaño de éstos parece ser similar a los observados en el segmento C de la haplocinetia, donde en el proceso de estomatogénesis aparecerá el vestigio del escutico ciliado.

Microscopía electrónica de transmisión

La infraciliación somática está constituida por cinetias con cinetosomas dobles en la parte anterior celular y sencillos en la posterior, como se observó por medio de impregnaciones con plata y con microscopía electrónica de barrido. Los cinetosomas presentan fibras cinetodésmicas asociadas muy largas que casi se superponen a las de los cinetosomas inmediatamente anteriores (Lámina

10 c). Las bandas postciliares y transversas están compuestas por cuatro microtubulos en paralelo (Lámina 10 a, b), como en U. marinum. Los cinetosomas presentan un saco parasómico asociado que, en el caso de los cinetosomas dobles, se sitúa exactamente entre ellos a su izquierda y en el caso de los sencillos sobre el cinetosoma y ligeramente desviado hacia la izquierda (Lámina 10 a, b).

El condrioma en este clon está también formado por mitocondrias gigantes de crestas tubulares que recorren la zona subpelicular entre cinetias de un extremo al otro de la célula (Láminas 10 a, b, c y 11 a).

El área bucal se pudo observar en sección longitudinal en alguno de sus tramos (Lámina 11 a, b). Se puede observar parte de las polycinetias M1, M2, M3 y el citostoma con su membrana unitaria. La polycinetia 1 parece haber sido seccionada en una parte que es ciliada, ya que se observan 4 cinetosomas con sus respectivos cilios y un cinetosoma más anterior seccionado lateralmente, que se corresponde con el cinetosoma anterior entre las dos líneas de cinetosomas que componen esta cinetia (Figura 9).

En la polycinetia 2 (M2), seccionada lateralmente, es curioso observar como los cinetosomas posteriores parecen quedar situados oblicuamente a la superficie celular, quedando sus cilios probablemente dirigidos hacia el área del citostoma. Esta disposición hace evidente la dificultad en la observación de dicha área por medio de impregnaciones ya que en un plano estos cinetosomas quedaran superpuestos unos con otros. Asimismo, es evidente que las polycinetias dos y tres quedan contiguas directamente, lo cual es difícil de observar por la razón ya apuntada anteriormente. La polycinetia 3 (M3), como en el caso de U. marinum y como los cinetosomas posteriores de la polycinetia 2 (M2), quedan situados en el comienzo de la depresión del citostoma quedando en posición oblicua con respecto a la superficie celular, por esta razón sus cilios, como ya se observó por medio de microscopía electrónica de barrido,

quedan dirigidos posteriormente cubriendo la superficie del citostoma.

Las crestas observadas por medio de microscopía electrónica de barrido se pudieron observar en sección longitudinal con microscopía electrónica de transmisión, mostrando una de las crestas laterales de la polycinetia 2 (Lámina 11 a, b), o en secciones tangencial a ambos lados de dicha polycinetia (Lámina 11 c). Parece que en este caso el repliegue de la membrana está soportado por un esqueleto microtubular que corre longitudinalmente en el interior de dichas crestas.

El aparato nuclear está constituido sólo por un macronúcleo, como ya se observó en el caso de la utilización de impregnaciones argénticas. Éste presenta nucleolos granulares en la periferia que parecen sobresalir en algunos casos de la superficie nuclear bajo la membrana. Estos parecen ser menos numerosos que los observados en el caso de U.marinum. También aparecen numerosos cuerpos cromatínicos dispersos en la matriz nuclear.

Las bacterias endosimbiontes observadas por medio de la impregnación con carbonato de plata amoniacal se pueden observar principalmente en la parte anterior, por encima del macronúcleo (Lámina 11 a, b).

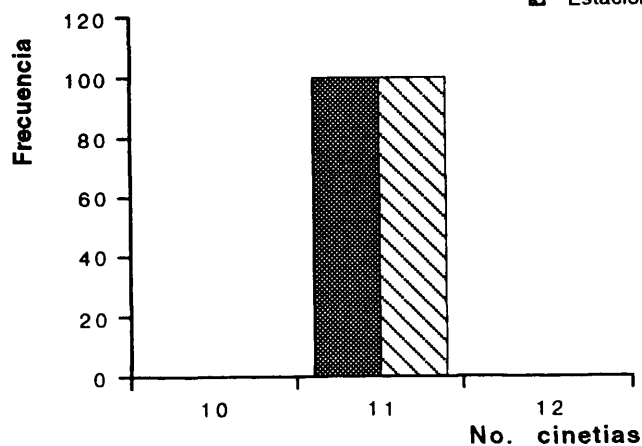
Los cortes transversales de la zona del citostoma muestran la membrana unitaria que nos permite diferenciar el límite entre éste área y la película celular que además del plasmalema presenta las dos membranas alveolares. En este caso no fueron observadas las típicas vesículas discoidales observadas en el caso de U.marinum, sin embargo, si se observaron numerosas vesículas globulares probablemente pertenecientes a las vacuolas alimenticias que se están formando en dicha área.

Se observó asimismo, la presencia de retículo endoplasmático rugoso (RER) directamente debajo de las

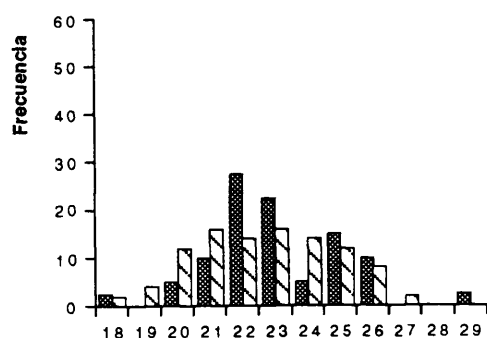
mitocondrias, como se ha observado en otros trabajos sobre Uronema (Kaneshiro and Holz, 1976). Finalmente, se observó asociado a las mitocondrias un sistema membranal de naturaleza tubular interpuesto entre las mitocondrias y el RER. Las membranas tubulares de este sistema parecen estar íntimamente asociadas con las membranas externas de las mitocondrias, aunque este extremo no se pudo comprobar.

Parauronema acutum

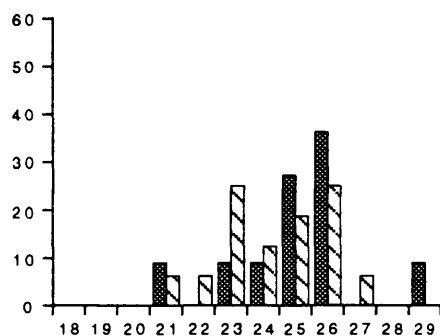
■ Exponencial
▨ Estacionaria



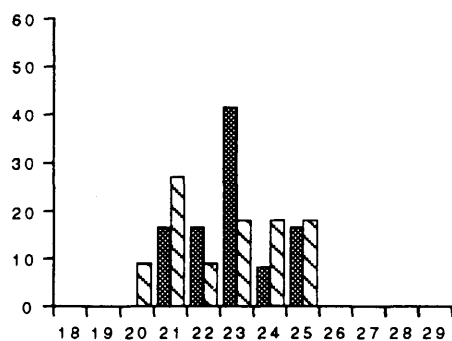
No. cinetosomas/cinetia



Primera cinetia



Ultima cinetia



Otras cinetias

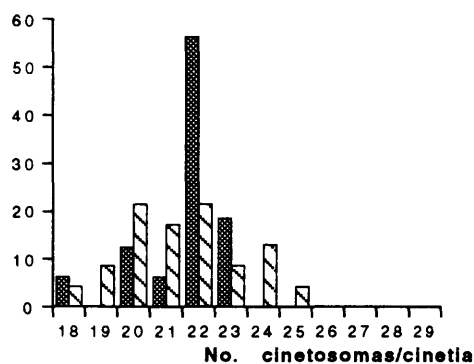


Figura 15.-

Distribución por frecuencias del número de cinetias somáticas y el número de cinetosomas por cinetia (a.- en total, b.- en la primera cinetia, c.- en la última cinetia d.- en otras cinetias) en *P.acutum* en ambas fases de crecimiento.

Este clon se aisló de una muestra procedente de la playa de Tanjung Kling (Melaka, Malasia) recogida en Septiembre de 1990.

Microscopía óptica

Los ciliados pertenecientes a este clon, presentaban la mismas características de movimiento ya descritas anteriormente para Uronema marinum y Uronema schewiakoffi respectivamente. Sin embargo, el tamaño y la forma celular parecen ser más pequeños que el de dichos clones, especialmente en fase estacionaria de crecimiento.

Infraciliación somática

El número de cinetias somáticas en este clon es de nueve en ambas fases de crecimiento, aunque como en los otros casos, aparece un cierto bajo porcentaje de células con ocho, diez u once cinetias. La Figura 16 muestra la distribución de cinetias observada en ambas fases.

La disposición relativa de las cinetias en la célula es en este clon similar a las descrita para U. marinum y U. schewiakoffi. La primera cinetia comienza anteriormente con un cinetosoma sencillo seguido inmediatamente por un par de cinetosomas. La última cinetia somática comienza a nivel de la tercera posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas y la segunda posición cinetosómica de la primera cinetia somática (Lámina 12 b), respectivamente.

El número de cinetosomas por cinetia se encuentra entre diez y veinticuatro en fase estacionaria y entre quince y veintidos en fase exponencial, si consideramos todos los conteos de las cinetias en total (Figura 16). La distribución en el número de cinetosomas por cinetia según

el tipo de cinetia se puede observar asimismo, en la Figura 16 y Tabla 25.

Infraciliación bucal

La posición de la región bucal en fase estacionaria de crecimiento aparece centrada, aproximadamente en situación ecuatorial.

La polycinetia 1 o M1 está compuesta por una línea de cuatro o cinco cinetosomas no ciliados en frente de la segunda y tercera posiciones cinetosómicas de la última cinetia somática. A veces la línea es más gruesa centralmente, como si hubiera otros dos cinetosomas laterales, como se observó para los otros dos clones de Uronema descritos hasta ahora (Lámina 12 b, c).

La polycinetia 2 o M2 está constituída por tres líneas de cinco cinetosomas cada una. La forma observada de esta polycinetia en el caso de la impregnación con nitrato de plata parece ser trapezoidal (Lámina 12 d).

La polycinetia 3 o M3 está compuesta por tres líneas de cinetosomas oblicuas de cuatro, tres y dos cinetosomas respectivamente. Ésta queda muy cerca de la haplocinetia de manera que parece ser continua con ella (Lámina 12b,12d).

La haplocinetia está compuesta por cinetosomas dobles dispuestos en dos líneas en zig-zag y otra línea externa de sacos parasómicos como se observó en los casos descritos previamente, y sólo son observables por medio de la impregnación con carbonato de plata. El segmento A de la haplocinetia parece presentar la línea más interna de cinetosomas más larga anteriormente que la línea externa, siendo por lo tanto la haplocientia sencilla en este tramo anterior (Lámina 12 b, d). Ésta comienza anteriormente al mismo nivel que la parte anterior de M2. Este segmento A

está compuesto por cinco o seis cinetosomas ciliados. El segmento B de la haplocinetia está constituido por doce a trece cinetosomas.

El segmento C de la haplocinetia o vestigio del escutico esta constituido por tres cinetosomas dispuestos en los vértices de un triángulo invertido justo debajo del extremo del segmento B de la haplocinetia.

Aparato nuclear

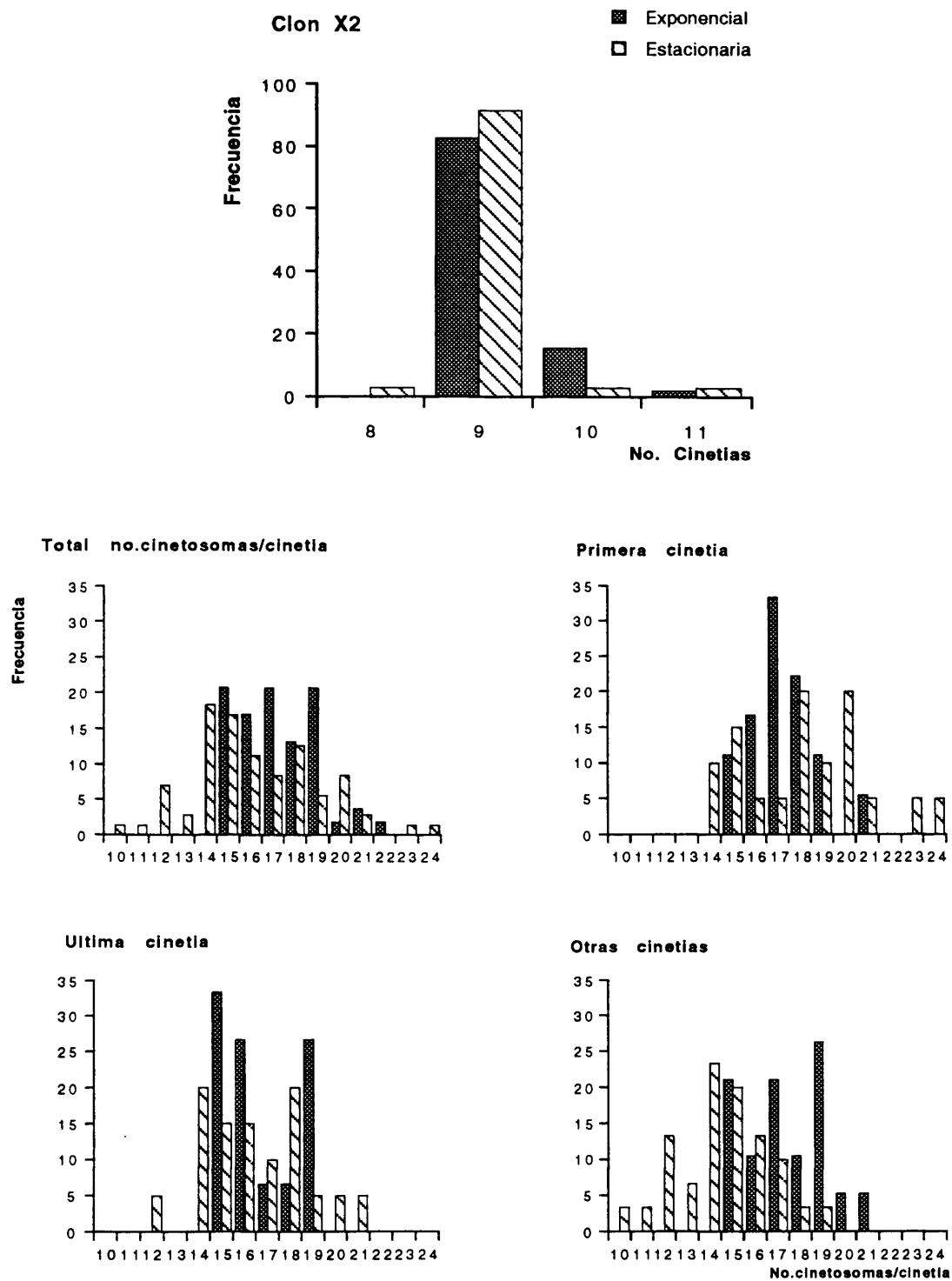
El macronúcleo es ovalado o redondeado y presenta posición ecuatorial en fase estacionaria de crecimiento, mientras que en fase exponencial tiende a situarse sobre el plano ecuatorial hacia la parte anterior celular, debido a la numerosa presencia de vacuolas en esta fase de crecimiento (Lámina 12 a, b).

El micronúcleo está presente y queda situado anteriormente y adosado al macronúcleo. A veces queda ligeramente desviado hacia un lateral del macronúcleo.

En este clon se observaron algunas células que parecían estar en conjugación con dos o tres núcleos (fase exponencial de crecimiento).

El poro de la vacuola contráctil está situado al final de la segunda cinetia somática.

La impregnación con protargol, como ya se ha observado en los otros clones descritos, no dio buenos resultados al quedar teñidos tanto cilios como mucocistos en la superficie celular (Lámina 12 e, f).



Este clon se aisló de una muestra procedente del estuario del Tajo en Lisboa (Portugal) recogida en Septiembre de 1990.

Microscopía óptica

Las células *in vivo* de este clon presentaron las mismas características en cuanto a comportamiento que las descritas anteriormente para los otros clones de Uronema.

Infraciliación somática

El número de cinetias somáticas presentes en este clon fue mayoritariamente doce en fase exponencial de crecimiento y once en fase estacionaria. En ambas fases, sin embargo, se observó cierta variación entre diez y doce cinetias. La Figura 17 muestra la distribución de cinetias en cada una de las fases de crecimiento.

Este clon, como algunos de los otros clones descritos hasta ahora, presenta la primera posición cinetosómica de la primera cinetia ocupada por un cinetosoma sencillo más un par de cinetosomas muy cerca uno del otro. Estos quedan aproximadamente a nivel de la segunda posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas. La última cinetia comienza asimismo, aproximadamente a nivel de la tercera posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas, y de la segunda posición cinetosómica de la primera cinetia somática. Todas las cinetias somáticas terminan posteriormente al mismo nivel, incluso la última, que en los otros clones descritos terminaba más cerca del complejo basal del cilio caudal. Se forma así posteriormente un círculo muy regular delimitado por todas las cinetias somáticas. Desde el complejo basal del cilio caudal aparece una fibra cinetodésmica muy patente dirigida hacia la

última cinetia somática.

El número de cinetosomas por cinetia se encuentra entre catorce y veinticinco en fase estacionaria de crecimiento y entre quince y veinticinco en fase exponencial (Figura 17). La distribución en el número de cinetosomas por cinetia según el tipo de cinetia se puede observar, asimismo, en la Figura 17 para la primera, última u otras cinetias. Parece como en los otros casos que la primera cinetia presenta un mayor número de cinetosomas que la última, y ambas mayor que el resto de las cinetias somáticas (Tabla 25).

Infraciliación bucal

La polycinetia 1 o M1 está formada por una línea de cinco cinetosomas no ciliados. La última posición cinetosómica de esta polycinetia parece más grande que el resto como formada por dos cinetosomas en el caso de la impregnación con carbonato de plata. En el caso de la impregnación con nitrato de plata es más difícil observar dos cinetosomas independientes, pero esta posición es más amplia que aquéllas ocupadas por un único cinetosoma, como si la polycinetia a ese nivel se bifurcara. Esta polycinetia queda situada en frente de la tercera o entre la tercera y cuarta posiciones cinetosómicas de la última cinetia somática (Lámina 13 b, d, e, g).

La polycinetia 2 o M2 está compuesta por tres líneas de cinco cinetosomas. Su forma, en las observaciones con nitrato de plata, es casi rectangular.

La polycinetia 3 o M3, aunque fue muy difícil de observar, parece estar formada por tres líneas oblicuas de cuatro, tres y dos cinetosomas respectivamente, como ya se ha descrito en los clones anteriores.

La haplocinetia está formada por dos líneas de

cinetosomas dispuestos en zig-zag. El segmento A está formado por cinco o seis cinetosomas, y la línea externa de cinetosomas parece ser más corta que la interna.

El segmento C o vestigio del escutico fue difícil de observar en el caso de la impregnación con carbonato de plata, pero parece estar formado como en los otros casos por tres cinetosomas dispuestos en los vértices de un triángulo invertido situado al final del extremo del segmento B de la haplocinetia. Éste fue claramente visible con la impregnación de nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff) (Lámina 13 e).

Aparato nuclear

El macronúcleo es muy regular redondeado y central o ligeramente desviado hacia la parte anterior de la célula en el caso de la fase de crecimiento exponencial, debido al abundante número de vacuolas (Lámina 13 a).

El micronúcleo no se observó, aunque a veces en el principio de la fase de división, el macronúcleo parece presentar un micronúcleo muy pequeño ($< 1 \mu\text{m}$).

El poro de la vacuola contráctil queda situado al final del extremo posterior de la segunda cinetia somática.

La impregnación con protargol, como ya se ha observado en los otros clones descritos, no dió buenos resultados al quedar teñidos tanto cilios como mucocistos en la superficie celular (Lámina 13 f, h).

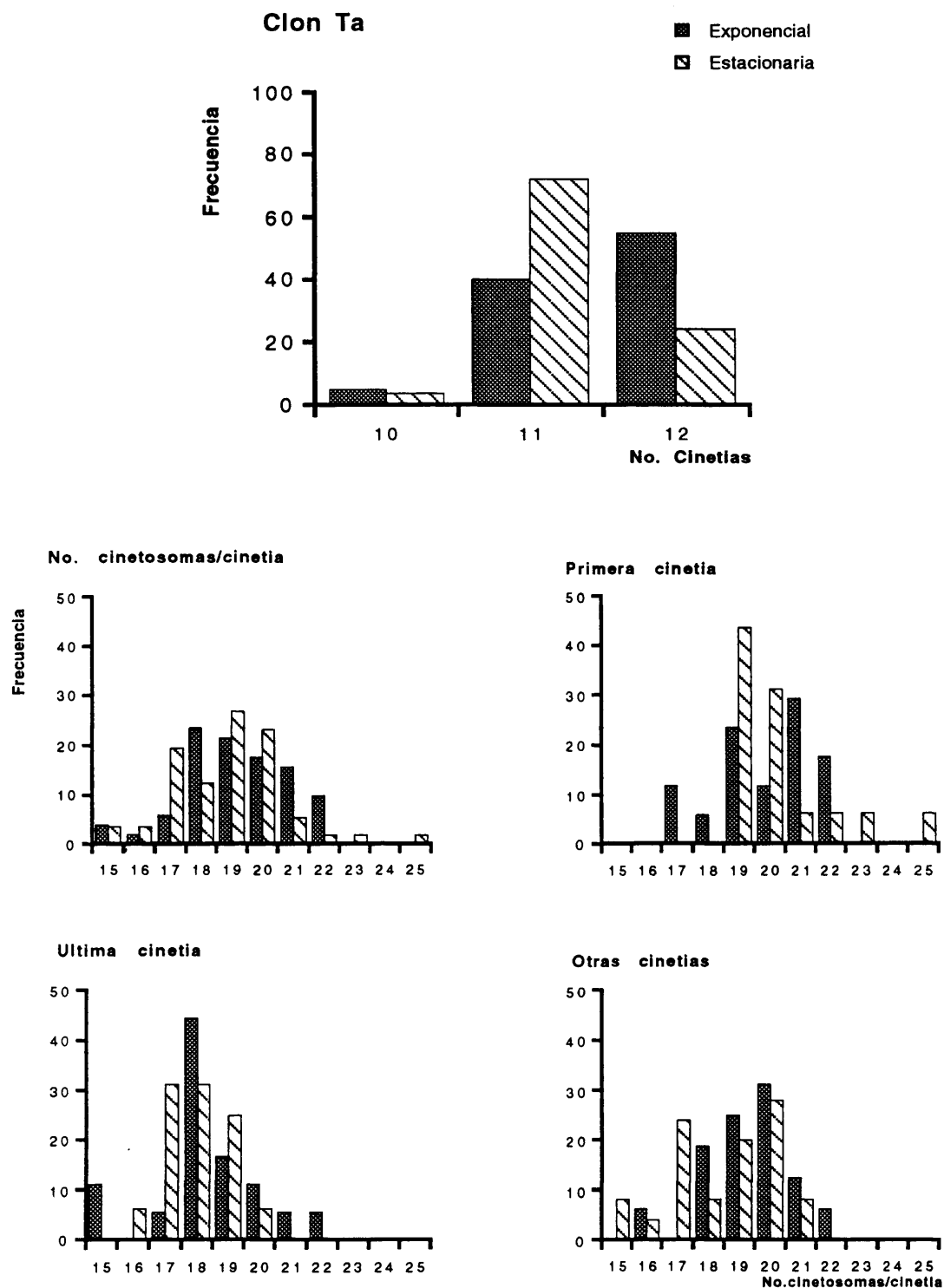


Figura 17.- Distribución por frecuencias del número de cinetias somáticas y el número de cinetosomas por cinetia (a.- en total, b.- en la primera cinetia, c.- en la última cinetia d.- en otras cinetias) del clon Ta en ambas fases de crecimiento.

Este ciliado fue aislado de una muestra procedente de la playa de Tsilivi en la isla de Zante (Grecia) recogida en Octubre de 1990.

Microscopía óptica

Las células *in vivo* de este clon se comportaron de la misma manera que el clon de U. marinum. La forma celular, sin embargo, en este caso es más pequeña y ovalada que la descrita para el clon de U. marinum. El casquete anterior celular es más prominente y está claramente inclinado hacia la parte dorsal celular (Figura 12).

Infraciliación somática

Este ciliado presenta mayoritariamente once cinetias meridianas en ambas fases de crecimiento. Sin embargo, también en ambas fases, se encontraron células con diez y doce cinetias respectivamente, en una proporción más baja, dependiendo de la fase de crecimiento (Figura 18).

La primera cinetia comienza un poco más abajo del círculo anterior formado por el resto de las cinetias, concretamente queda a nivel de la segunda posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas. El primer cinetosoma de esta primera cinetia es sencillo, seguido por un par de cinetosomas, como se ha observado en algunos de los otros clones. La última cinetia comienza anteriormente a nivel de la tercera posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas y la segunda de la primera cinetia somática respectivamente, de la que queda justo debajo de su primera posición cinetosómica, muy cercana a ella (Lámina 14 a, b, d, g).

La primera cinetia es una posición cinetosómica más

corta que el resto de las cinetias somáticas en la parte posterior de la célula, mientras que la última cinetia somática es una posición más larga que el resto, quedando más cerca del complejo basal del cilio caudal (Lámina 14 a, b, c).

Las cinetias meridianas delimitan anteriormente un casquete que queda inclinado en la célula hacia la región dorsal celular (Lámina 14 f). En el polo posterior de la célula, éstas delimitan, asimismo, otro casquete regular, ya que todas las cinetias excepto la última terminan al mismo nivel, en cuyo centro queda el complejo basal del cilio caudal (Lámina 14 h).

El complejo basal del cilio caudal está constituido por tres estructuras que quedan unidas por una línea argentófila; esta línea une por un lado el último cinetosoma de la última cinetia somática y por otro la sexta cinetia somática. Este complejo de tres estructuras está formado por un cinetosoma más dos sacos parasómicos, aunque este extremo no se puede comprobar más que con el empleo de microscopía electrónica (Kaneshiro and Holz, 1976).

El número total de cinetosomas por cinetia se encuentra entre once y doce en fase estacionaria de crecimiento y entre doce y dieciseis en fase exponencial (Figura 18). La primera y última cinetias presentan el mismo número de cinetosomas, mientras que las otras suelen presentar un número menor (Tabla 25).

Infraciliación bucal

La polycinetia 1 o M1 queda a nivel entre el primer y segundo pares de cinetosomas de la última cinetia, a la que se encuentra muy cercana, no paralela a ella, sino formando un ligero ángulo con respecto a ella (Lámina 14 a, b, c, e, g). Está formada por cinco cinetosomas no

ciliados, de los cuales el central, está desviado hacia la última cinetia, confirmando forma de llave (}) (Lámina 14 a, b). Esta policinetia queda situada en frente de las posiciones cinetosómicas primera y tercera de la última cinetia somática. La impregnación con nitrato de plata de células en fase exponencial de crecimiento mostró la misma estructura y situación de esta policinetia observada con carbonato de plata, esto es, cinco cinetosomas en línea con el cinetosoma central ligeramente desviado hacia la última cinetia somática (Lámina 14 c, d, e).

La policinetia 2 o M2 está formada por tres líneas de cinetosomas de cuatro, cuatro y dos cinetosomas respectivamente. Está situada al nivel de las posiciones cinetosómicas quinta y novena de la última cinetia somática (Láminas 14 a, b, c, d, e). Esta policinetia con la impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff), presenta forma trapezoidal, aunque no se pueden distinguir cinetosomas individuales en ella (Láminas 14 c, d, e).

La policinetia 3 o M3, como en los otros clones descritos, está formada por tres líneas en posición oblícua de cuatro, tres y dos cinetosomas, respectivamente (Lámina 14 a, b). La forma es triangular en el caso de la impregnación con nitrato de plata (Lámina 14 c, d, e).

La haplocinetia está formada por dos líneas de cinetosomas dobles dispuestas en zig-zag, la línea más externa parece ser más corta que la interna y es la única ciliada. Ésta suele estar situada ligeramente por debajo del extremo anterior de M2. Esta haplocinetia porta diecinueve cinetosomas ciliados, seis en el segmento A y doce en el segmento B (Lámina 14 a, b).

El segmento C o vestigio del escutico, difícil de observar con la impregnación con carbonato de plata, presenta, como en la mayoría de los clones descritos hasta ahora, tres cinetosomas dispuestos en los vértices de un

triángulo invertido situado al final del segmento B de la haplocinetia. Esta estructura es fácilmente identificable en las impregnaciones con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff) (Lámina 14 d, e).

Aparato nuclear

El macronúcleo es ovalado y con posición central y ligeramente desviado hacia la parte anterior de la célula, principalmente en la fase exponencial de crecimiento.

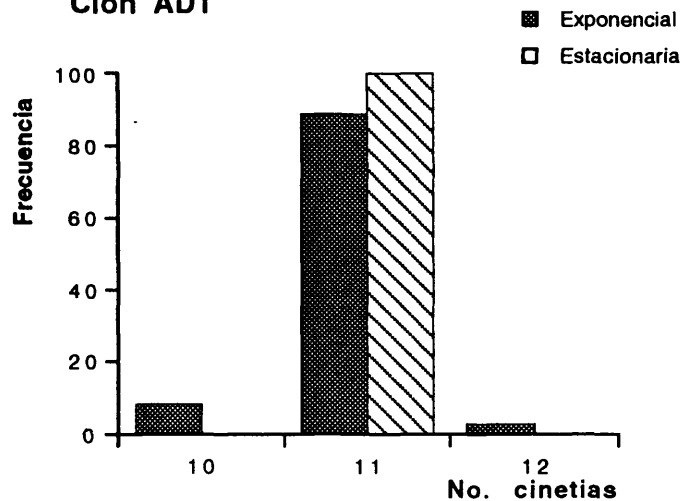
El micronúcleo no se observó, aunque en algunos ejemplares se observó material nuclear lateralmente al macronúcleo con un tamaño aproximado de 1 μm , que pudiera tratarse de un micronúcleo. En cualquier caso, el micronúcleo parece que quedaría incluido en el macronúcleo, haciéndose sólo visible durante el proceso de división.

El poro de la vacuola contráctil está situado al final de la segunda cinetia debajo del último cinetosoma.

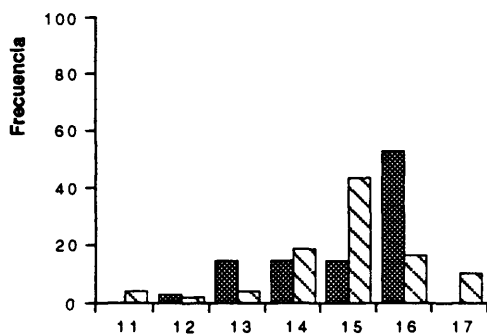
El citopigio se encuentra entre el segmento C de la haplocinetia y el polo posterior celular, en la línea argentófila que une el vestigio del escutico con el último cinetosoma de la primera cinetia somática (Lámina 14 c, d, e).

La utilización de la impregnación con protargol no produjo buenos resultados en este caso, de nuevo debido a la impregnación muy oscura, tanto de cilios como de mucocistos que impidieron la observación de cualquier otra estructura celular (Lámina 14 i, j).

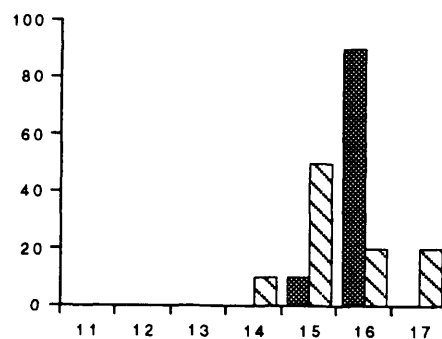
Clon AD1



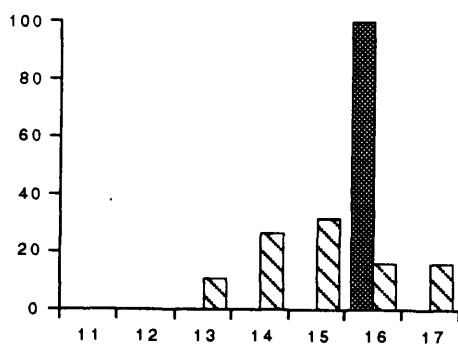
No. cinetosomas/cinetia



Primera cinetia



Ultima cinetia



Otras cinetias

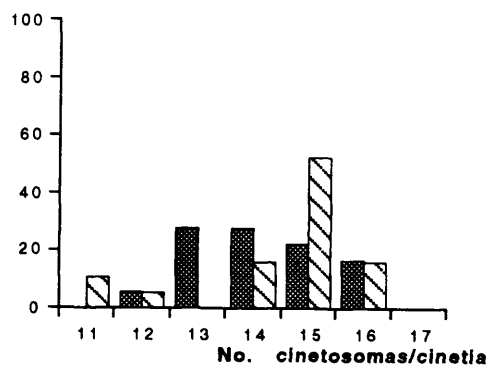


Figura 18.-

Distribución por frecuencias del número de cinetias somáticas y el número de cinetosomas por cinetia (a.- en total, b.- en la primera cinetia, c.- en la última cinetia d.- en otras cinetias) del clon AD1 en ambas fases de crecimiento.

Este ciliado fue aislado de una muestra procedente de la playa de Tsilivi en la isla de Zante (Grecia) recogida en Octubre de 1990.

Microscopía óptica

Las células *in vivo*, presentaron la mismas características de comportamiento descritas para U.marinum y U.schewiakoffi.

Infraciliación somática

El número de cinetias meridianas es generalmente diez en ambas fases de crecimiento, aunque se observaron también células de nueve, once y doce cinetias, respectivamente, pero menor proporción. La Figura 19 muestra la distribución de éstas en ambas fases.

La primera cinetia presenta anteriormente un cinetosoma seguido por un par de cinetosomas muy próximos como se observó en los otros clones. Esta primera posición cinetosómica de la primera cinetia está situada a nivel de la segunda posición cinetosómica del resto de las cinetias. La primera posición cinetosómica de la última cinetia queda, como en los otros clones, a nivel de la tercera posición cinetosómica en el resto de las cinetias somáticas, excepto de la primera, de la que queda a nivel de su segunda posición cinetosómica (Lámina 15 c, f, g).

El número total de cinetosomas por cinetia se encuentra entre doce y veinte en fase estacionaria y entre quince y veinte en fase exponencial de crecimiento (Figura 19). La primera cinetia presenta un número mayor de cinetosomas que la última. Durante la fase estacionaria de crecimiento el resto de las cinetias parecen tener siempre

un número menor de cinetosomas que la primera y la última, mientras que en fase exponencial parece ocurrir al contrario (Tabla 25).

Infraciliación bucal

La polycineta 1 o M1 es una línea de cinco cinetosomas no ciliados, situados bien en frente de las posiciones cinetosómicas dos y tres de la última cinetia somática o bien en frente de la tercera. Algunas veces se observó esta línea sencilla engrosada en la parte central hacia la última cinetia somática como si hubiese otros dos cinetosomas laterales, al igual que se observó en los clones de U.marinum y U.schewiakoffi.

La polycineta 2 o M2 está formada por tres líneas de cinco, cinco y tres (la más alejada de la haplocinetia) cinetosomas, respectivamente. Esta polycineta se encuentra situada entre la quinta y sexta posiciones cinetosómicas de la última cinetia.

La polycineta 3 o M3 está formada por tres líneas de cinetosomas dispuestas oblicuamente a la haplocinetia constituidas por cuatro, tres y dos cinetosomas, respectivamente. Esta polycineta está situada frente a la séptima posición cinetosómica de la última cinetia somática.

La haplocinetia está formada por dos líneas de cinetosomas dobles dispuestas en zig-zag. El segmento A está formado por ocho cinetosomas (contando sólo una de las líneas) mientras que el segmento B porta generalmente once. Está emplazada frente a las posiciones cinetosómicas sexta y décima de la última cinetia somática.

El segmento C de la haplocinetia o vestigio del escutico, aunque difícil de observar con la impregnación con carbonato de plata amoniacal excepto en aquellas

células en proceso de división, tiene una estructura de cinetosomas dispuestos en los vértices de un triángulo invertido situado en el extremo posterior del segmento B de la haplocinetia (Lámina 15 a, c, d, e, f, g).

En este clon se observaron, como ya se ha explicado en alguno de los clones anteriores, la presencia de células con dos áreas bucales dispuestas opuestamente.

Aparato nuclear

El macronúcleo central y ovalado, ligeramente desviado sobre el plano ecuatorial en fase estacionaria de crecimiento celular. En fase exponencial queda completamente desplazado hacia el extremo anterior celular debido al elevado número de vacuolas en el citoplasma celular (Lámina 15 a, b, c, j).

El micronúcleo no se observó en ninguna de las dos fases de crecimiento estudiadas.

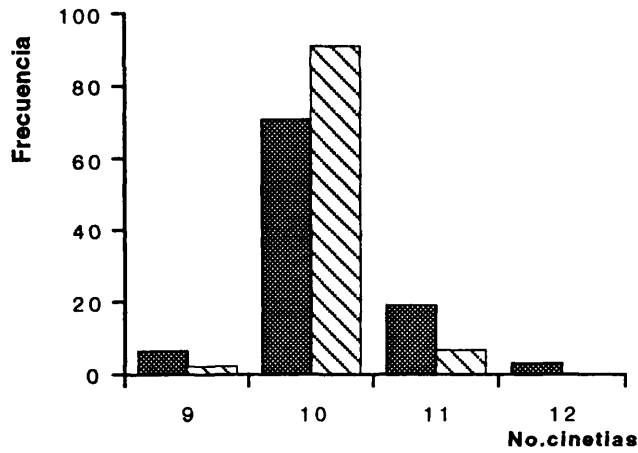
El poro de la vacuola contráctil se puede observar situado al final de la segunda cinetia somática (Lámina 15 h).

El citopigio está situado debajo del segmento C de la haplocinetia, entre éste y el polo posterior celular y entre la primera y última cinetias. Se puso de manifiesto únicamente mediante la impregnación con nitrato de plata (Lámina 15 d, f).

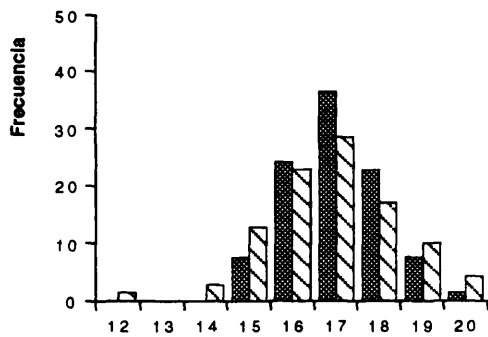
El empleo de la impregnación con protargol no produjo buenos resultados, como se puede observar en la Lámina 15 i, j.

Clon AD2

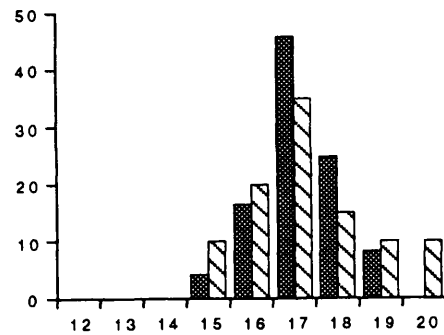
■ Exponencial
▨ Estacionaria



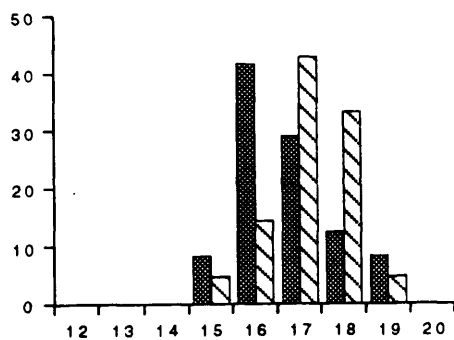
No. cinetosomas/cinetia



Primera cinetia



Ultima cinetia



Otras cinetias

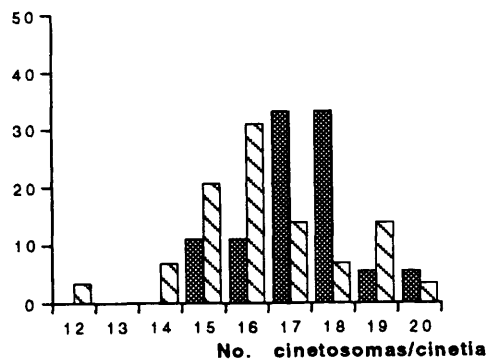


Figura 19.- Distribución por frecuencias del número de cinetias somáticas y el número de cinetosomas por cinetia (a.- en total, b.- en la primera cinetia, c.- en la última cinetia d.- en otras cinetias) del clon AD2 en ambas fases de crecimiento.

Este ciliado fue aislado de una muestra procedente de la costa de Tallahassee, Florida (EEUU) tomada en Noviembre de 1990.

Microscopía óptica

Las células *in vivo* de este clon se comportaron exactamente como se ha descrito anteriormente para U. marinum y U.schewiakoffi. Asimismo, la forma celular en ambas fases de crecimiento fue similar a las descritas en aquellos casos (Figura 12).

Infraciliación somática

Este clon presenta nueve cinetias somáticas en ambas fases de crecimiento, aunque se encontraron células de diez y once cinetias, respectivamente, dependiendo de la fase en la que se encontraba la célula. Las Figura 20 muestra la distribución de cinetias segun las fases.

La disposición de cinetias en la célula fue similar a las ya descritas anteriormente para el clon de U.marinum, comenzando la primera cinetia anteriormente a nivel de la segunda posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas y la última a nivel de la tercera posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas. Posteriormente todas las cinetias terminan al mismo nivel formando un círculo regular excepto la última cinetia que es un cinetosoma más larga (Lámina 16 a, d, e).

La primera posición cinetosómica de la primera cinetia somática presenta un cinetosoma sencillo seguido por un par, ambos muy juntos, como se observó para U.marinum.

El número total de cinetosomas por cinetia se

encuentra entre doce y veinticinco en fase estacionaria de crecimiento y entre quince y veinticuatro en fase exponencial (Figura 20). La primera cinetia tiende a presentar un mayor número de cinetosomas que la última o el resto de las cinetias (Tabla 25).

Infraciliación bucal

La polycinetia 1 o M1 es una línea de cuatro o cinco cinetosomas no ciliados, situada frente a la tercera posición cinetosómica de la última cinetia somática o entre la segunda y tercera posiciones cinetosómicas (Lámina 16 a, c, d, e), respectivamente.

La polycinetia 2 o M2 está formada por tres líneas de cinco, cinco y tres cinetosomas respectivamente. Se situa entre las posiciones cinetosómicas quinta y sexta de la última cinetia somática (Lámina 16 a, c, d, e).

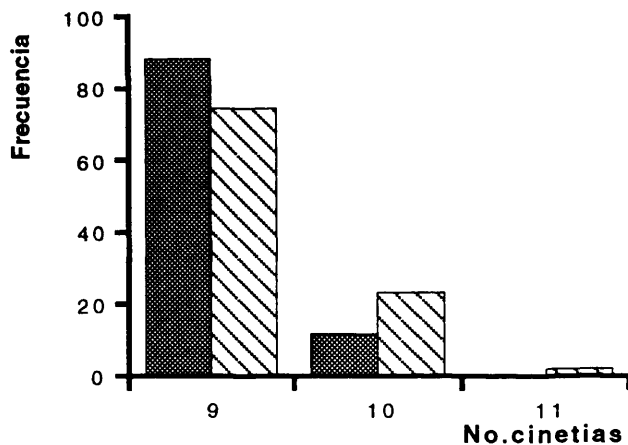
La polycinetia 3 o M3 está formada por tres líneas en posición oblicua con respecto a M2; con cuatro, tres y dos cinetosomas justo frente a la posición cinetosómica séptima de la última cinetia somática (Lámina 16 a, c, d, e).

La haplocinetia está formada por dos líneas de cinetosomas dobles dispuestos en zig-zag, de las cuales sólo la externa es ciliada. Como en el caso de U.marinum, se observó con impregnación de carbonato de plata una tercera línea externa que se corresponde con una línea de sacos parasómicos. Está localizada frente a las posiciones cinetosómicas quinta (o quinta y sexta) y novena de la última cinetia somática, comenzando anteriormente a nivel de la mitad de la polycinetia M2. El segmento A de la haplocinetia está constituido por siete u ocho cinetosomas dobles. El segmento B está constituido por once o doce cinetosomas dobles (Lámina 16 a, c, d, e).

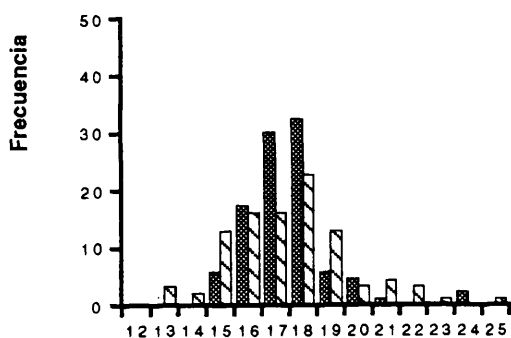
El segmento C de la haplocinetia o vestigio del

Clon AE21

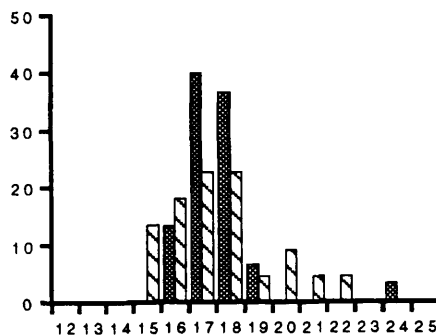
■ Exponencial
▨ Estacionaria



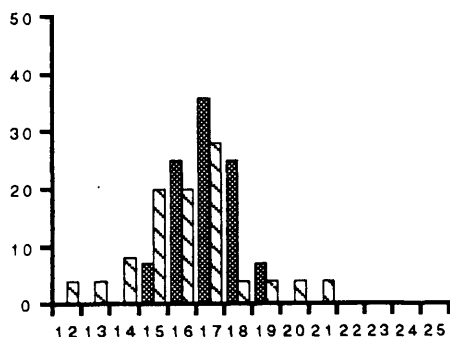
No. cinetosomas/cinetia



Primera cinetia



Ultima cinetia



Otras cinetias

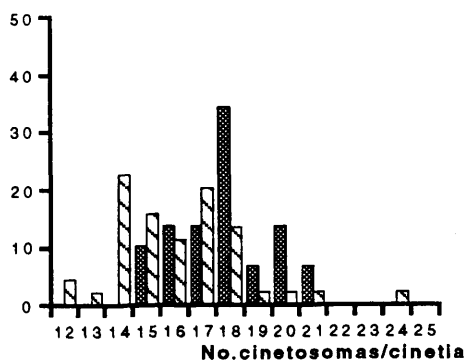


Figura 20.-

Distribución por frecuencias del número de cinetias somáticas y el número de cinetosomas por cinetia (a.- en total, b.- en la primera cinetia, c.- en la última cinetia d.- en otras cinetias) del clon AE21 en ambas fases de crecimiento.

Este ciliado fue aislado de una muestra procedente de la costa de Tallahassee, Florida (EEUU) tomada en Noviembre de 1990.

Microscopía óptica

Las células *in vivo* de este clon presentaron un comportamiento similar al descrito para el clon de U.marinum. La forma celular, sin embargo, en este caso es más pequeña y ligeramente redondeada, como ocurría en el clon AD1. Asimismo, el casquete anterior celular es más prominente y está claramente inclinado hacia la parte dorsal celular (Figura 12).

Infraciliación somática

Las células de este clon presentan generalmente doce cinetias somáticas en ambas fases de crecimiento, aunque pueden aparecer células con once o trece cinetias. La Figura 21 muestra la distribución por frecuencias del número de cinetias en ambas fases de crecimiento.

La disposición de las cinetias es similar a las ya descritas. Así, la última cinetia es casi una posición cinetosómica más corta que la primera cinetia somática, empezando justo debajo de esta, y un par más corta que el resto de las cinetias somáticas (Lámina 17 a). La primera posición cinetosómica de la primera cinetia somática está ocupada por un cinetosoma sencillo más un par de cinetosomas muy cercanos, que quedan a nivel de la segunda posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas (Láminas 17 a, b, d, e y 18 a, c, d, e). Todas las cinetias somáticas forman anteriormente un círculo regular libre de ciliación, excepto - como ya se ha indicado - la primera y la última que quedan un poco por debajo del resto de las

cinetias somáticas. Este casquete queda inclinado hacia el area dorsal celular. En la parte posterior de la célula ocurre lo mismo, pero la última cinetia somática es un cinetosoma más larga que el resto de las cinetias, mientras que la primera suele ser una posición cinetosómica más corta que el resto de las cinetias somáticas (Láminas 17 a, g y 18 b, h).

El número de cinetosomas por cinetia en este clon se encuentra entre doce y veinte en fase exponencial de crecimiento y doce y dieciocho en fase estacionaria (Figura 21). La distribución por frecuencias del número de cinetosomas segun la fase de crecimiento y la cinetia de que se trate aparece en la Figura 21 y Tabla 25.

Infraciliación bucal

El área bucal de este clon está situada sobre el plano ecuatorial. Su tamaño es grande si se compara con el tamaño celular.

La polycinetia 1 o M1 está formada por una línea de cinco cinetosomas no ciliados, en la cual el cinetosoma central está ligeramente desviado hacia la derecha (última cinetia somática), dando la impresión de tener forma como de llave (}). Queda situada entre la primera y segunda posiciones cinetosómicas de la última cinetia somática, de la que queda extremadamente cerca, lo que hace bastante difícil su observación (Láminas 17 a, b, c, e y 18 a, b, c, d, e, f).

La polycinetia 2 o M2 está compuesta por tres líneas de cinetosomas, de las cuales la primera y segunda líneas más cercanas a la haplocinetia son de cuatro cinetosomas y la externa, más lejos de la haplocinetia está formada únicamente por dos cinetosomas. Está situada en frente de las posiciones cinetosómicas cuarta y quinta de la última cinetia somática (Lámina 17 a, b, e, f y 18 b, d, e, f, g).

La polycinetia 3 o M3 está formada por tres líneas en posición oblicua con respecto a M2 de cuatro, tres y dos cinetosomas, respectivamente. Está situada en frente de la posición cinetosómica sexta de la última cinetia somática (Láminas 17 a, b, e, f y 18 b, d, e, f, g).

La haplocinetia está constituida por dos líneas de cinetosomas dispuestos en zig-zag, de las cuales la externa parece ser más corta que la interna anteriormente. Existe una línea externa de sacos parasómicos, como ya se ha observado en los otros clones. Está situada a nivel de las posiciones cinetosómicas cuarta a novena o décima de la última cinetia somática (Lámina 17 a, b, e y 18 b, d, e, f, g).

El segmento C de la haplocinetia o vestigio del escutico no se pudo observar claramente en la impregnación con carbonato de plata, excepto en aquellas células que ya se encontraban en proceso de división. En el caso de la impregnación con nitrato de plata, se observó como en los otros casos como tres cinetosomas situados en los vértices de un triángulo invertido situado al final del segmento B de la haplocinetia (Láminas 17 f y 18 d, g; Figura 8).

Aparato nuclear

El macronúcleo es redondeado y regular, ligeramente desviado hacia el area anterior celular, algunas veces puede presentar ciertas irregularidades principalmente cuando el proceso de división esta comenzando (Láminas 17 a y 18 a).

El micronúcleo o bien no se observó, o aparecía como una masa extremadamente pequeña ($1\text{ }\mu\text{m}$ o menor) adosada lateralmente al macronúcleo. Esta observación fue llevada a cabo sobre células en proceso temprano de división y parece salir del macronucleo en división.

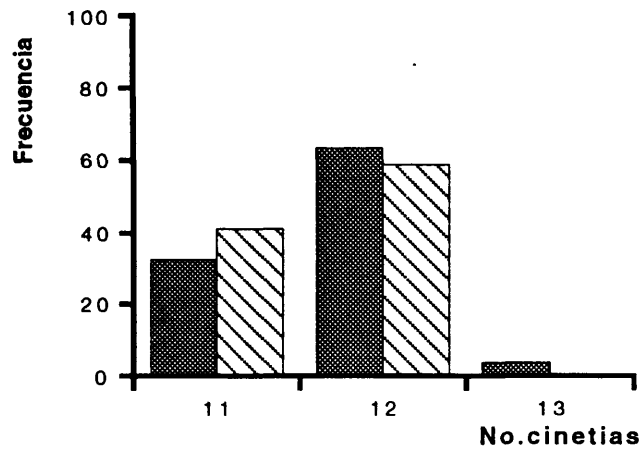
El poro de la vacuola contráctil está situado debajo del último cinetosoma de la segunda cinetia somática (Lámina 18 g).

El citopigio situado entre la primera y última cinetias somáticas, se localiza entre el segmento C de la haplocinetia y el polo posterior celular.

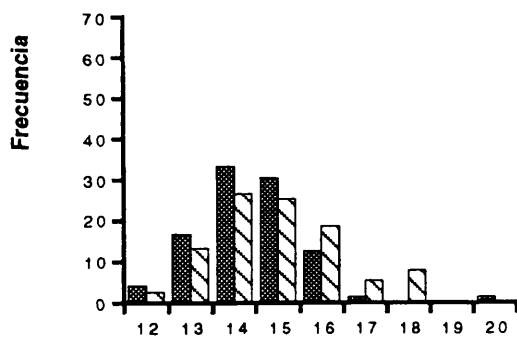
La impregnación con protargol tampoco dio buenos resultados en este clon, como se puede observar en la Lámina 17 i, j.

Clon AE22

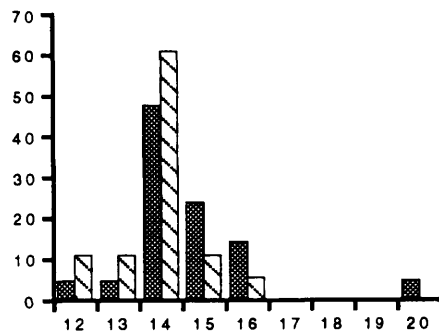
■ Exponencial
▨ Estacionaria



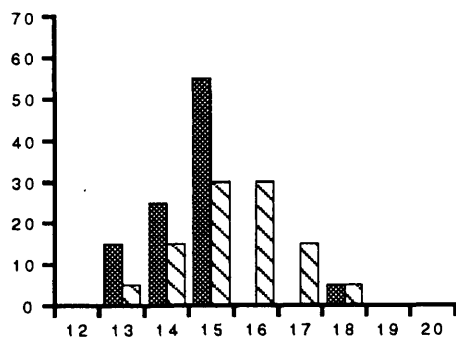
No. cinetosomas/cinetia



Primera cinetia



Ultima cinetia



Otras cinetias

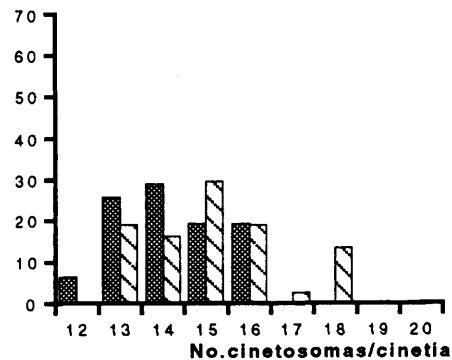


Figura 21.- Distribución por frecuencias del número de cinetias somáticas y el número de cinetosomas por cinetia (a.- en total, b.- en la primera cinetia, c.- en la última cinetia d.- en otras cinetias) del clon AE22 en ambas fases de crecimiento.

Este ciliado fue aislado de una muestra recogida en Wimereux (Francia) en Marzo de 1991.

Microscopía óptica

Las células *in vivo* de este clon, parecen ser más pequeñas que las estudiadas hasta ahora y presentan forma de pera. Su comportamiento recuerda al de los otros clones de Uronema descritos hasta ahora (Figura 11).

Infraciliación somática

El número de cinetias somáticas en este clon es generalmente de catorce en ambas fases de crecimiento. Se encontraron también células de trece y quince cinetias - con menor frecuencia - respectivamente (Figura 22).

La primera cinetia comienza anteriormente a nivel de la segunda posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas. La primera posición cinetosómica está ocupada por un cinetosoma más un par muy cerca de él. La última cinetia somática comienza debajo de la primera posición cinetosómica de la primera cinetia, o la segunda posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas (Láminas 19 a, d, e y 20 c). Las cinetias somáticas delimitan anterior y posteriormente dos círculos regulares libres de cilios, las excepciones son, en la parte anterior la primera y última cinetias que quedan un poco por debajo de ese círculo y, en la parte posterior, la última cinetia que suele ser un cinetosoma más larga, quedando más cercana al complejo basal del cilio caudal (Lámina 19 f). El círculo anterior es más pequeño que el observado para el resto de los clones estudiados hasta ahora (Láminas 19 e y 20 c).

El complejo basal es muy patente en este clon,

observándose claramente el círculo argentófilo alrededor del cuerpo basal del cilio caudal (Lámina 19 f). Parece como si el cilio caudal estuviera alojado en una pequeña depresión, probablemente mayor que en los otros clones estudiados hasta ahora, así las sales de plata se depositarían en los bordes de esta depresión marcando un círculo argentófilo.

Las cinetias somáticas presentan un número muy elevado de cinetosomas para el tamaño celular observado en este ciliado. Así, las células en fase exponencial de crecimiento presentan entre trece y veintitres cinetosomas por cinetia, respectivamente, y entre catorce y veintitres en fase estacionaria (Figura 22; Lámina 19 b)

Infraciliación bucal

El tamaño del área bucal es lo primero que llama la atención en este clon. El área bucal considerada como la distancia desde el punto anterior de la polycinetia M1 hasta el posterior de la haplocinetia (final del segmento B), es muy grande con respecto al tamaño celular, ocupando en células en fase estacionaria de crecimiento casi la longitud total del ciliado (Lámina 20 b). Su situación en ese caso con respecto a la primera o ultima cinetias, es entre el primer o segundo cinetosomas anteriores y el penúltimo o antepenultimo posteriores, respectivamente. En fase exponencial, la situación del área bucal, sin embargo, parece centrarse más en la célula (Lámina 19 a, b, c).

La polycinetia 1 o M1 es muy larga y está formada por seis o siete cinetosomas no ciliados en línea. Queda situada entre las posiciones cinetosómicas segunda y cuarta (o quinta) de la ultima cinetia somática, quedando muy cercana a M2. Su posición está ligeramente inclinada con respecto a la última cinetia. Las células más pequeñas parecen tener menor numero de cinetosomas en M1 (Láminas 19 a, b, c, d, e y 20 b, c, d, e).

La polycinetia 2 o M2 porta cilios muy largos y claramente visibles. La forma de esta polycinetia es más estrecha y se inclina anteriormente hacia la derecha (hacia la última cinetia) alejándose de la haplocinetia paroral. Está constituida por tres líneas de cinetosomas, siendo las dos líneas más cercanas a la haplocinetia aproximadamente iguales. La primera línea más cercana a la haplocinetia está constituida por cinco cinetosomas y la siguiente por cuatro. La tercera y más alejada de la haplocinetia está constituida por sólo dos o tres cinetosomas. Su forma, en el caso de la impregnación con nitrato de plata, es muy larga y más o menos rectangular. Está situada a nivel de las posiciones cinetosómicas séptima y octava o sexta y séptima de la última cinetia somática, respectivamente (Láminas 19 a, b, d, e y 20 b, d, e).

La polycinetia 3 o M3 está formada por tres líneas de cinetosomas situadas en posición oblicua con respecto a la M2. De cuatro, tres y un cinetosomas, respectivamente, su forma en el caso de la impregnación con nitrato de plata es triangular mientras que en el resto de los clones descritos parecía romboidal. Su situación con respecto a la última cinetia somática es a nivel de las posiciones cinetosómicas novena y décima u octava y novena, en fase exponencial de crecimiento (Láminas 19 b, c, d y 20 b, d, e).

La haplocinetia, compuesta por dos líneas de cinetosomas dispuestas en zig-zag, comienza anteriormente casi al mismo nivel que el extremo posterior de M2. Esta tiene una forma peculiar que claramente diferencia los dos segmentos A y B, más claramente en el caso de la impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff) que con carbonato de plata amoniacal (Láminas 19 b, d y 20 d, e). En fase estacionaria de crecimiento el final de la haplocinetia en el segmento B suele quedar al nivel del penúltimo o antepenultimo cinetosoma de la última cinetia somática. El segmento A suele estar constituido por ocho cinetosomas mientras que B consta de diez u once

cinetosomas. En fase exponencial de crecimiento esta haplocinetia está situada entre la octava y duodecima posiciones cinetosómicas de la última cinetia somática.

El segmento C o vestigio del escutico fue difícil de observar con la impregnación con carbonato de plata, excepto en las células en división. Parece estar formado por tres cinetosomas o estructuras (Figura 11), dispuestas en los vértices de un triángulo invertido al final del segmento B de la haplocinetia (Lámina 20 e).

Aparato nuclear

El macronúcleo y micronúcleo son muy grandes para el tamaño del ciliado si comparamos con los otros clones de Uronema estudiados. El macronúcleo suele quedar encajado en la parte anterior celular y es redondeado y central. El micronúcleo está adosado a la parte anterior del macronúcleo quedando encajado asimismo anteriormente (Lámina 20 a, g).

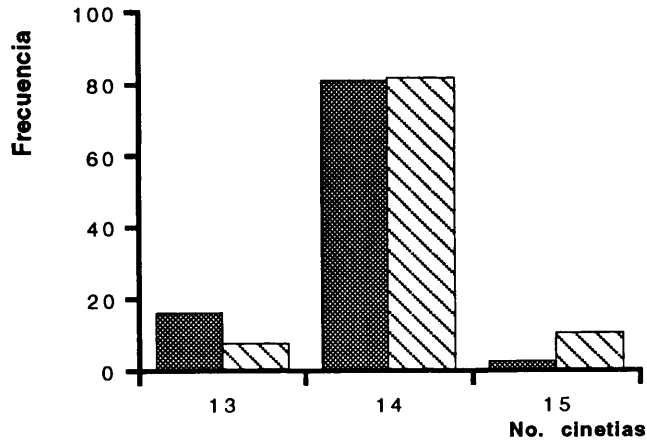
El poro de la vacuola contráctil abre al final de la segunda cinetia somática.

El área a la que queda restringido el citopigio es muy pequeña, debido normalmente a la gran superficie ocupada por la región bucal. Como en los otros casos, está situada entre las cinetias primera y última entre el área del segmento C de la haplocinetia y el polo posterior celular (Lámina 20 e).

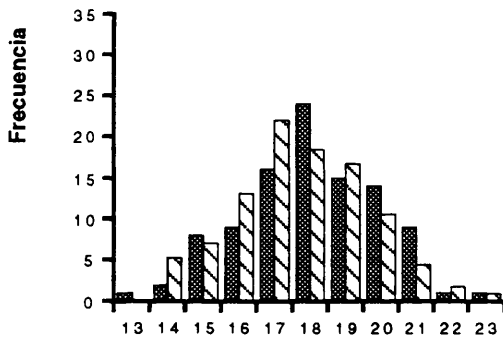
La impregnación con protargol, no dió buenos resultados. Sin embargo, esta impregnación produce, para este clon, reducción en el tamaño de los núcleos (Lámina 20 g).

Clon SWi1

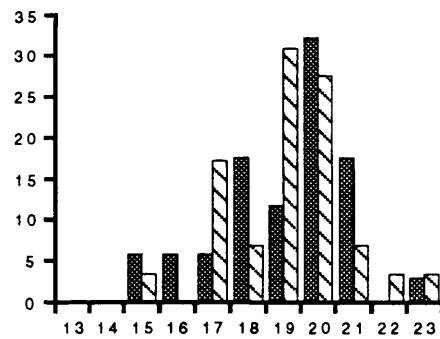
■ Exponencial
□ Estacionaria



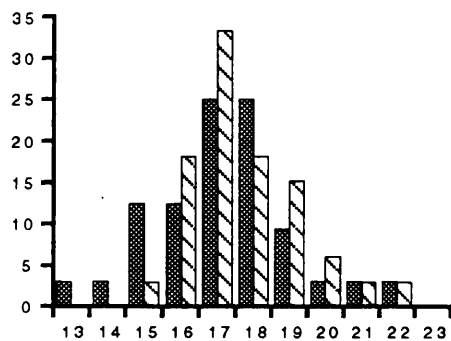
No. Cinetosomas/cinetia



Primera cinetia



Ultima cinetia



Otras cinetias

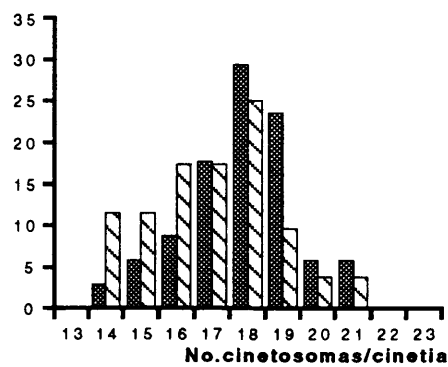


Figura 22.-

Distribución por frecuencias del número de cinetias somáticas y el número de cinetosomas por cinetia (a.- en total, b.- en la primera cinetia, c.- en la última cinetia d.- en otras cinetias) del clon SWi1 en ambas fases de crecimiento.

Este clon fue aislado de una muestra recogida en el muelle de SIO en Enero de 1990.

Microscopía óptica

La células *in vivo* de este clon presentan características morfológicas y de comportamiento similares a las descritas para el clon de U. marinum.

Infraciliación somática

El número de cinetias somáticas oscila entre doce y trece dependiendo de la fase de crecimiento de la que se trate, aunque también se observaron, con una frecuencia muy baja, células de diez, once y catorce cinetias, respectivamente. La Figura 23 muestra la distribución observada para ambas fases.

La disposición de las cinetias unas con respecto a otras es similar a las descritas anteriormente para el clon de U. marinum, esto es, tanto la primera como la última cinetia en el área anterior comienzan ligeramente por debajo del círculo anterior libre de cilios formado por el resto de las cinetias somáticas (Lámina 21 b, c). Asimismo, la primera cinetia comienza anteriormente al mismo nivel de la segunda posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas, mientras que la última cinetia somática tiende a situarse aproximadamente a nivel de la tercera posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas. En el area posterior, todas las cinetias delimitan un círculo regular excepto la última cinetia que es un cinetosoma más larga que el resto, conectando con el complejo basal del cilio caudal, desde el que una fibra cinetodésmica aparece en su dirección (Lámina 21 c, g).

La primera posición cinetosómica de la primera cinetia somática, presenta un cinetosoma sencillo seguido inmediatamente por un par. El resto de la cinetia, como en los ciliados descritos previamente, presenta cinetosomas dobles en su mitad anterior, siendo el resto sencillos (Lámina 21 b, c).

El complejo del cilio caudal presenta un cinetosoma más otras dos estructuras argentófilas que son sacos parasómicos (Kaneshiro and Holz, 1976). Este complejo queda unido por líneas argentófilas al extremo posterior de la última cinetia somática y por otro al extremo posterior de la octava cinetia somática (Lámina 21 g).

El número de cinetosomas por cinetia en este clon se encuentra entre trece y veintitres en fase estacionaria o entre catorce y veinticinco en fase exponencial (Figura 23; Tabla 25).

Infraciliación bucal

La polycinetia 1 o M1 es una línea de cuatro o cinco cinetosomas no ciliados situada en frente de las posiciones cinetosómicas tercera y cuarta de la última cinetia somática, como en el clon de U. marinum. En algunos casos se observó que lateralmente la parte derecha de esta polycinetia parecía estar engrosada por dos cinetosomas en el centro (Lámina 21 b, c).

La polycinetia 2 o M2 parece estar constituida por tres líneas de cinco cinetosomas cada una. Se encuentra situada entre las posiciones cinetosómicas sexta y séptima de la última cinetia somática (Lámina 21 b, c). En el caso de la impregnación con nitrato de plata la forma de dicha polycinetia es trapezoidal (Lámina 21 f).

La polycinetia 3 o M3 está constituida por tres líneas dispuestas oblicuamente de cuatro, tres y dos cinetosomas,

respectivamente, situada en frente de la séptima posición cinetosómica de la última cinetia somática (Lámina 21 c, f).

La haplocinetia está constituida por dos líneas de cinetosomas dobles dispuestos en zig-zag, con ocho cinetosomas situados en el segmento A y once en B. Como en los casos descritos anteriormente, se observó una tercera línea externa de estructuras, en el caso de la tinción con carbonato de plata, que se identificó posteriormente como de sacos parasómicos. Esta haplocinetia comienza anteriormente aproximadamente a nivel de la posición media de la policinetia 2 o M2 y se sitúa entre las posiciones cinetosómicas sexta y novena de la última cinetia somática (Lámina 21 b, c).

El segmento C de la haplocinetia o vestigio del escutico fue, como en los otros morfotipos, difícilmente observable en el caso de la impregnación con carbonato de plata amoniacal, excepto en aquellos casos en división. La impregnación con nitrato de plata, sin embargo, permitió su observación como tres cinetosomas dispuestos de nuevo en los vértices de un triángulo invertido dispuesto debajo del extremo posterior del segmento B de la haplocinetia (Lámina 21 e).

En este clon se observaron, asimismo, células con dos áreas bucales en posiciones opuestas en la célula.

Aparato nuclear

El macronúcleo es redondeado u oval y se encuentra en posición central más o menos a nivel ecuatorial en la célula, tendiendo a estar desplazado más anteriormente en fase exponencial. No se observó ningún micronúcleo, aunque en algunos casos lateralmente al macronúcleo apareció lo que pudiera ser un micronúcleo muy pequeño ($< 1 \mu\text{m}$).

El poro de la vacuola contráctil está situado al final de la segunda cinetia somática (Lámina 21 g).

El citopigio sólo se pudo observar claramente por medio de la impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Queda situado entre la primera y última cinetias somáticas, entre la haplocinetia y el polo posterior celular (Lámina 21 f).

Los resultados con la impregnación con protargol pueden ser observados en la Lámina 21 h, i.

Clon C11

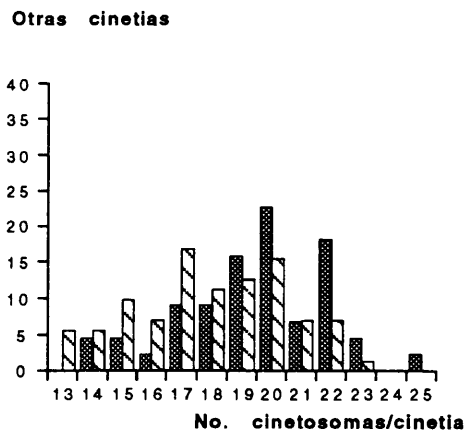
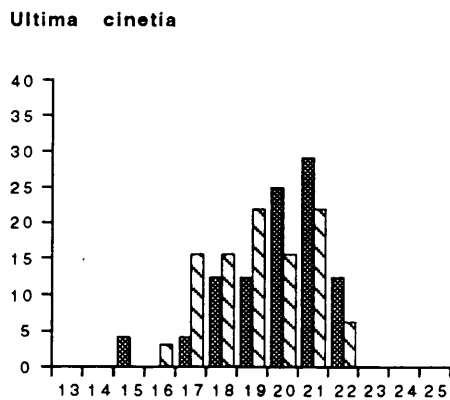
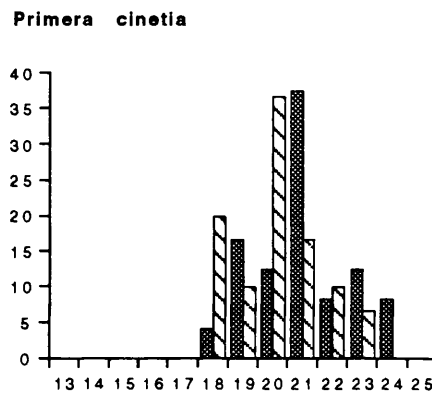
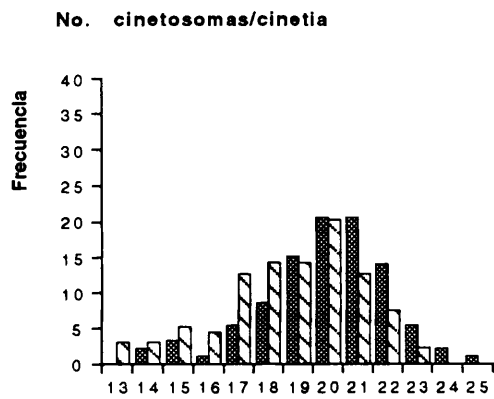
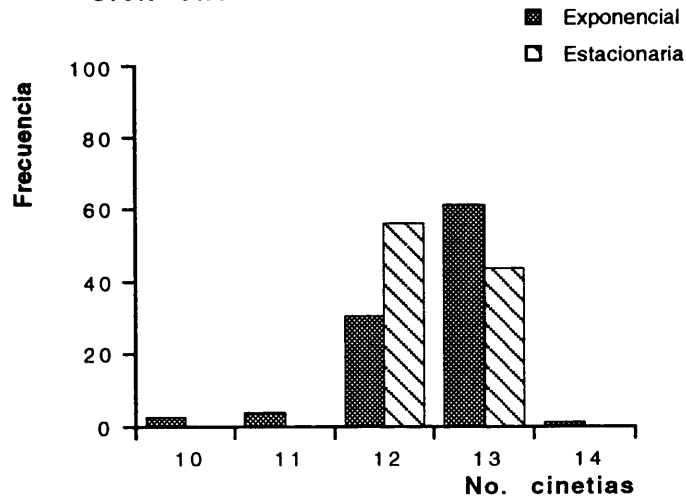
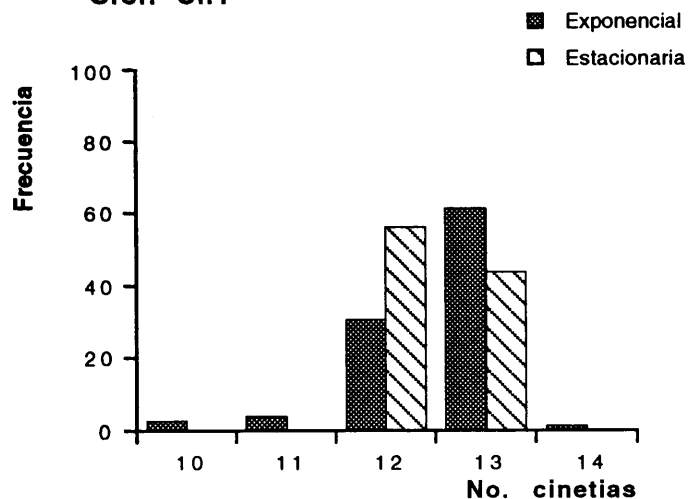
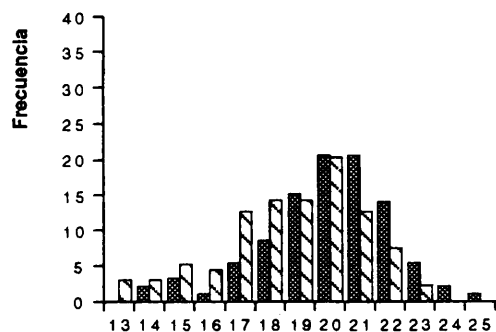


Figura 23.- Distribución por frecuencias del número de cinetias somáticas y el número de cinetosomas por cinetia (a.- en total, b.- en la primera cinetia, c.- en la última cinetia d.- en otras cinetias) del clon C11 en ambas fases de crecimiento.

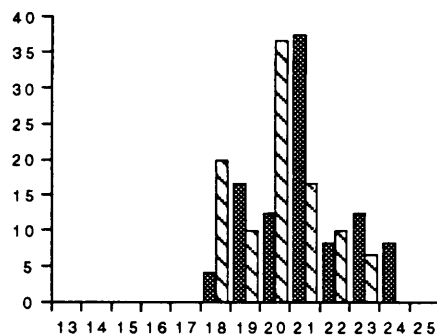
Clon Cil1



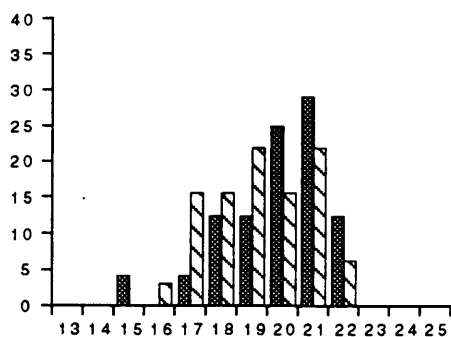
No. cinetosomas/cinetia



Primera cinetia



Ultima cinetia



Otras cinetias

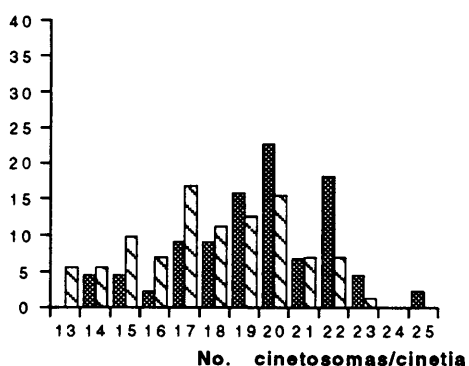


Figura 23.-

Distribución por frecuencias del número de cinetias somáticas y el número de cinetosomas por cinetia (a.- en total, b.- en la primera cinetia, c.- en la última cinetia d.- en otras cinetias) del clon Cil1 en ambas fases de crecimiento.

Este clon fue amablemente cedido a el laboratorio del Dr. Mark Ohman (Marine Life Research Group. SIO) por el Dr. Caron (Woods Hole Oceanographic Institution) en 1990. Fue clonado inmediatamente una vez en nuestro laboratorio.

Microscopía óptica

Este ciliado presenta un comportamiento *in vivo* esencialmente similar al clon U. marinum utilizado como referencia. La única diferencia fue que las células parecen estrecharse anteriormente produciendo una forma de pera muy típica en este clon.

Infraciliación somática

El número de cinetias somáticas mayoritariamente observado fue de nueve en ambas fases de crecimiento, aunque se observaron con una menor frecuencia células de ocho, once y doce cinetias, respectivamente, dependiendo de la fase de crecimiento (Figura 24).

La disposición de la primera y última cinetias fue en este caso similar a la ya descrita para el clon referencia U. marinum, quedando la primera y última cinetias una posición o dos posiciones, respectivamente, más abajo del círculo anterior formado por el resto de las cinetias somáticas (Lámina 22 a, e). La primera posición cinetosómica de la primera cinetia somática queda ocupada, asimismo, por un cinetosoma sencillo seguido por un par muy cercano (Lámina 22 a, b, d, e).

Las fibras cinetodésmicas en este clon, como en el caso anterior, suelen aparecer muy bien teñidas con la impregnación con carbonato de plata amoniacal.

El número de posiciones cinetosómicas por cinetia en este clon se encuentra entre trece y veintidos en fase exponencial de crecimiento o entre catorce y veintiun en fase estacionaria (Figura 24; Tabla 25). Parece en este caso de nuevo que la primera cinetia presenta más cinetosomas que la última y ésta más que el resto de las cinetias somáticas. Algunas de las cinetias observadas presentaban la cinetia completa con cinetosomas dobles.

Infraciliación bucal

La policinetia 1 o M1 es una línea de cuatro o cinco cinetosomas no ciliados, situada a nivel de la tercera posición cinetosómica o entre la segunda y la tercera posiciones de la última cinetia somática (Lámina 22 a, b, d, e, f, g). Esta policinetia en el caso de la impregnación con carbonato de plata amoniacal (Lámina 22 b) a veces apareció engrosada lateralmente como por otras dos estructuras argentófilas que no fueron visibles en el caso de la impregnación con nitrato de plata.

La policinetia 2 o M2 formada por tres líneas de cinco cinetosomas cada una, está situada frente a las posiciones cinetosómicas quinta y sexta o sexta y séptima de la última cinetia somática, respectivamente.

La policinetia 3 o M3 constituída por tres líneas dispuestas oblicuamente con respecto a la M2 de cuatro, tres y dos cinetosomas, está situada a nivel de la séptima (o entre séptima y octava) posición cinetosómica de la última cinetia somática.

La haplocinetia está constituída por una línea de cinetosomas dobles dispuestos en zig-zag, de las cuales sólo la externa es ciliada. Se observó, asimismo, otra línea externa de estructuras, en el caso de la impregnación con carbonato de plata amoniacal, que constituyen la línea externa de sacos parasómicos observados por medio de

microscopía electrónica en algunos de los otros clones estudiados. Está situada entre las posiciones cinetosómicas quinta y novena de la última cinetia somática. El segmento A de la haplocinetia está constituido por siete cinetosomas dobles, mientras que el segmento B está constituido por aproximadamente once cinetosomas dobles.

El segmento C de la haplocinetia o vestigio del escutico aparece, como en los otros casos como tres cinetosomas, situado en los vértices de un triángulo invertido debajo del extremo posterior del segmento B de la haplocinetia. Éste sólo pudo ser claramente observado por medio de la impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff).

Se observaron células con dos áreas bucales opuestas, así como células fusionándose unas a otras.

Aparato nuclear

El macronúcleo es oval y se encuentra en posición central y ecuatorial o ligeramente desviado hacia arriba en el caso de las células en fase exponencial de crecimiento (Lámina 22 c). El micronúcleo, pequeño y redondeado, está situado en la parte anterior del macronúcleo, adosado a él.

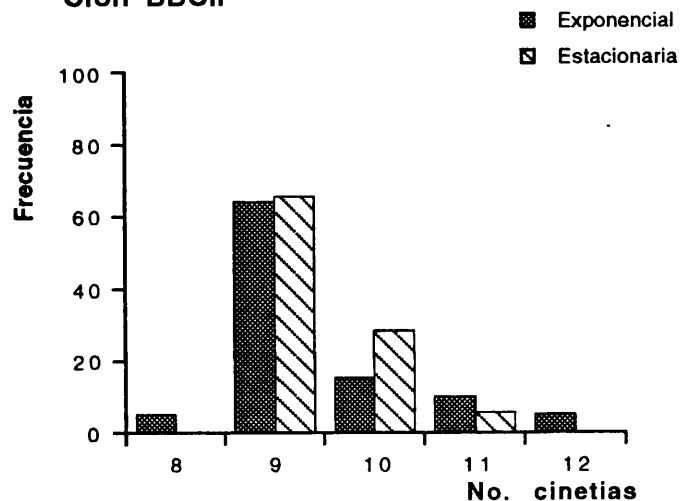
El poro de la vacuola contráctil está situado al final de la segunda cinetia somática (Lámina 22 b).

El citopigio se situa en la región ventral celular entre la primera y última cinetias somáticas, entre el extremo posterior de la haplocinetia y el polo posterior celular. Sólo fue claramente visible con la impregnación con nitrato de plata (Lámina 22 c).

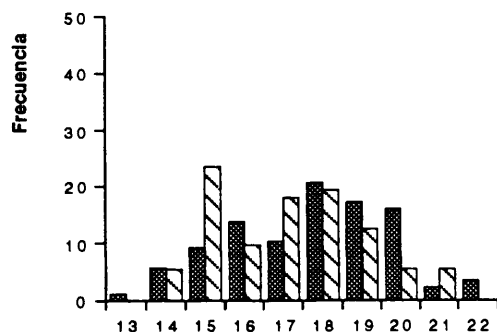
La impregnación con protargol como se puede observar en la Lámina 22 h, no dió buenos resultados al impregnar

cilios y mucocistos en la superficie celular, lo que impidió la correcta observación de la infraciliación.

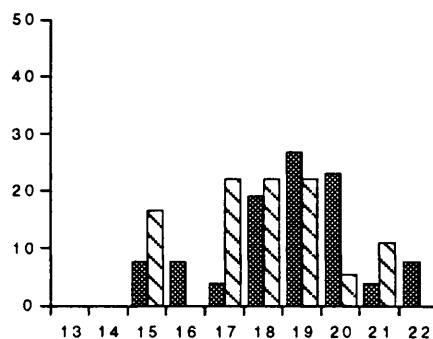
Clon BBCil



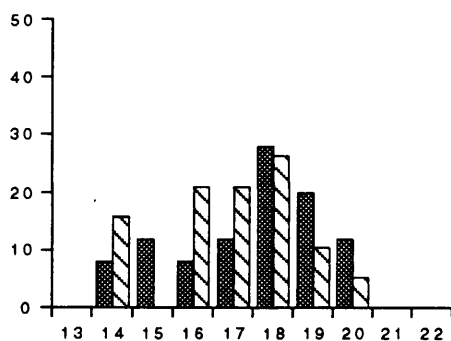
No. cinetosomas/cinetia



Primera cinetia



Ultima cinetia



Otras cinetias

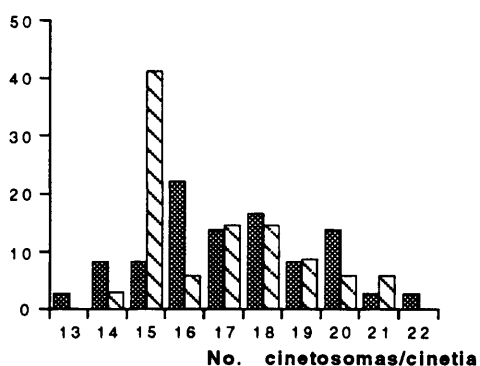


Figura 24.-

Distribución por frecuencias del número de cinetias somáticas y el número de cinetosomas por cinetia (a.- en total, b.- en la primera cinetia, c.- en la última cinetia d.- en otras cinetias) del clon BBCil en ambas fases de crecimiento.

Este clon fue aislado de una muestra procedente del acuario "Sea World" (San Diego, EE.UU) recogida durante Marzo de 1990.

Microscopía óptica

Las células *in vivo* de este clon no parecieron presentar diferencias significativas con el clon de U. marinum utilizado como referencia, excepto por la particularidad de que las células de este clon parecen ser más delgadas, y disminuyen de tamaño rápidamente si la fuente de alimentación, en nuestro caso bacterias, no se mantiene a un cierto nivel.

Infraciliación somática

El número de cinetias somáticas fue mayoritariamente de catorce en ambas fases de crecimiento, aunque aparecieron también células con doce, trece y quince cinetias somáticas dependiendo de la fase de crecimiento. La Figura 25 muestra la distribución en el número de cinetias dependiendo de la fase de crecimiento.

Las fibras cinetodésmicas en este clon aparecieron muy oscuras y claramente definidas en el caso de la impregnación con carbonato de plata amoniacal (Láminas 23 a, b y 24 a, b, d).

La primera posición cinetosómica de la primera cinetia somática está ocupada por un cinetosoma sencillo más un par de cinetosomas muy cerca uno del otro, como ocurre en la mayoría de los clones estudiados hasta ahora (Láminas 23 b y 24 a, b). Esta posición queda aproximadamente a nivel de la segunda posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas. La última cinetia en

este clon comienza aproximadamente a nivel de la tercera posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas, y de la segunda posición cinetosómica de la primera cinetia somática. En este clon, sin embargo, como ocurrió únicamente en el clon Ta, todas las cinetias terminan posteriormente al mismo nivel, incluso la última cinetia somática, que en los otros clones descritos terminaba más abajo que el resto. Se forma así posteriormente un círculo muy regular. Desde el complejo basal, aparece una fibra cinetodésmica muy patente dirigida hacia la última cinetia somática (Láminas 23 b, d y 24 b).

El número de posiciones cinetosómicas por cinetia en este clon se encuentra entre trece y veinticinco en fase estacionaria de crecimiento o entre dieciseis y veinticinco en fase exponencial. La distribución por frecuencias del número de cinetosomas segun la fase de crecimiento y la cinetia de que se trate aparecen en la Figura 25 y Tabla 25.

Infraciliación bucal

La polycinetia 1 o M1 está constituida por cuatro o cinco cinetosomas no ciliados. El último cinetosoma de esta polycinetia, como se observó en el caso del clon Ta, parece dividirse para dar lugar a dos o tres cinetosomas en esa posición situados en forma de triángulo o cuadrado unos con respecto a otros. Esta polycinetia está situada frente a la segunda o tercera posiciones cinetosómicas de la última cinetia somática (Láminas 23 b, c, e y 24 a, b).

La polycinetia 2 o M2 está constituida por tres líneas de cinco, cinco y tres cinetosomas, respectivamente. Está situada entre las posiciones cinetosómicas quinta y séptima de la última cinetia somática (Láminas 23 b, c, e y 24 a, b).

La polycinetia 3 o M3 constituida por tres líneas

dispuestas oblicuamente con respecto a M2 de cuatro, tres y dos cinetosomas, respectivamente. Está situada frente a las posiciones cinetosómicas octava y novena de la última cinetia somática.

La haplocinetia está formada por dos líneas de cinetosomas dispuestos en zig-zag, de la cual únicamente la externa es ciliada. Esta comienza anteriormente apróximadamente a nivel de la parte media de la policinetia 2 o M2, frente a las posiciones cinetosómicas sexta y duodécima de la última cinetia somática. El segmento A de la haplocinetia está constituido por ocho o nueve cinetosomas dobles, mientras que el segmento B consta de once o doce.

El segmento C o vestigio del escutico está formado por tres bases cinetosómicas dispuestas en los vértices de un triángulo invertido, situado bajo el extremo posterior del segmento B de la haplocinetia. Como ocurrió en los otros clones estudiados, fue difícil su observación por medio de la impregnación con carbonato de plata amoniacal, excepto en aquellas células en las que el proceso de estomatogénesis ya había comenzado, sin embargo su observación sí fue clara por medio de la impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff).

Aparato nuclear

El macronúcleo es oval o redondeado como se observó por medio de la impregnación con carbonato de plata amoniacal (Láminas 23 c, d y 24 g). Está situado centralmente en posición ecuatorial o ligeramente desviado hacia la parte anterior celular, en fase exponencial de crecimiento. El micronúcleo está situado sobre el macronúcleo y algunas veces no fue posible su observación pero con frecuencia muy baja, lo que hace pensar que en ciertas fases de la célula éste puede estar inclido más profundamente en el macronúcleo, de ahí la dificultad en

su observación. El micronúcleo suele separarse en fase de división del macronúcleo hacia la parte anterior celular, dejando un rastro de material nuclear entre ambos.

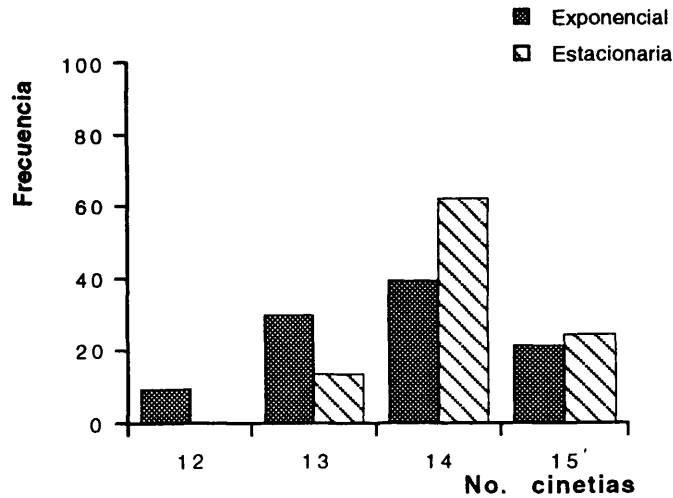
Se observaron en este clon algunos procesos de fusiones celulares, así como células con dos áreas bucales en posiciones opuestas.

El poro de la vacuola contráctil está situado al final de la segunda cinetia somática (Lámina 24 b, d).

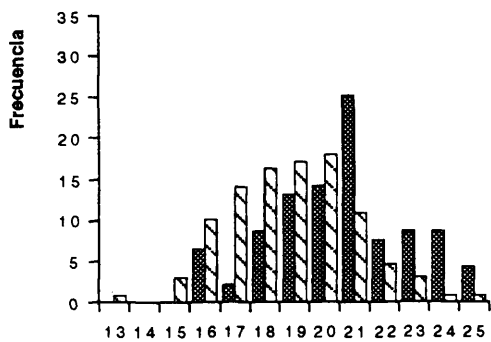
El citopigio se situa entre la primera y última cinetias somáticas, entre el extremo posterior de la haplocinetia y el polo posterior celular. Sólo fue claramente visible con la impregnación con nitrato de plata (Lámina 24 c).

La impregnación con protargol, como en los casos descritos hasta ahora, no dió buenos resultados (Lámina 24 f, g). El aparato nuclear fue, sin embargo, claramente visible (Lámina 24 g), lo cual si comparamos con los resultados de la impregnación con carbonato de plata amoniacal, nos da una idea del distinto efecto que esta tinción produce sobre el orgánulo nuclear, encogiéndolo.

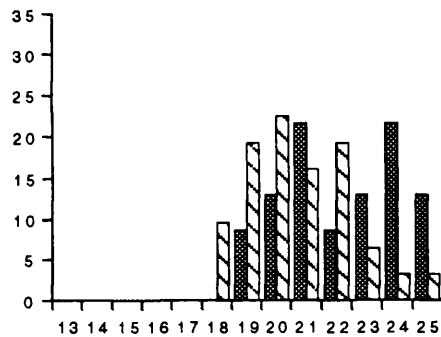
Clon Cil7



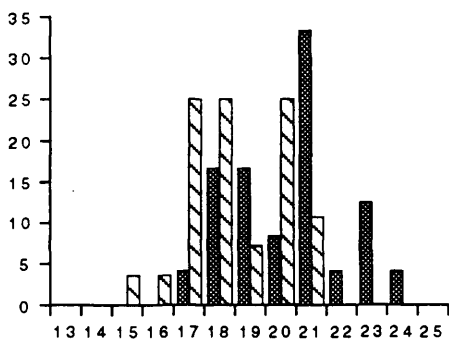
No. cinetosomas/cinetia



Primera cinetia



Ultima cinetia



Otras cinetias

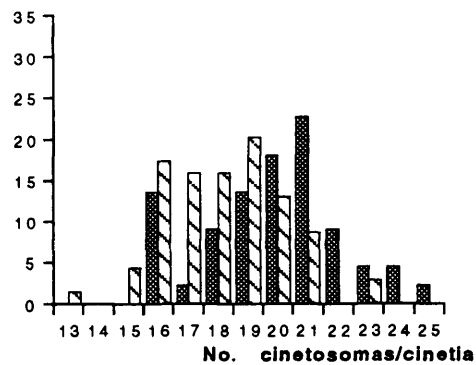


Figura 25.- Distribución por frecuencias del número de cinetias somáticas y el número de cinetosomas por cinetia (a.- en total, b.- en la primera cinetia, c.- en la última cinetia d.- en otras cinetias) del clon Cil7 en ambas fases de crecimiento.

Este ciliado marino fue aislado de una muestra de cultivo de rotíferos procedente de los tanques de Sea World (San Diego) recogida durante Marzo de 1990. Presenta, como el resto de los clones de Uronema aislados, todas las características típicas del género y fue identificado como morfotipo 4, perteneciente a la especie Uronema elegans.

Las principales diferencias encontradas en este clon con respecto al resto de los clones estudiados son el tamaño celular, el número de cinetias, el tamaño y la forma de las estructuras bucales, su situación y la posición y forma del núcleo.

Microscopía óptica

Las células *in vivo* de este clon se mueven de manera similar al clon ya descrito de U. marinum, sin embargo una diferencia fundamental es el tamaño celular que es ligeramente mayor que aquel, y la forma celular que es, asimismo, ligeramente diferente (Figura 12). Por ejemplo, las células de este clon no son tan delgadas como las de los clones de Uronema descritos en fase estacionaria de crecimiento. La parte anterior celular no es tan estrecha como en los otros casos, y parece que el casquete anterior no ciliado es más amplio, quedando asimismo inclinado hacia la región dorsal celular. La zona bucal es más conspicua, es más difícil de identificar *in vivo* y la membrana paroral es menos visible que en los otros casos.

Infraciliación somática

El número de cinetias somáticas asciende en este clon a dieciocho en ambas fases de crecimiento, aunque el rango de variación observado en las dos fases de crecimiento es mucho más amplio que las encontradas en cualquiera de los

otros clones estudiados, oscilando entre dieciseis y veintidos cinetias con menor frecuencia (Figura 26). Se ha de hacer notar aqui que el número de cinetias observado cuando el ciliado fue aislado, fue entre veintidos y veintitres, luego el mantenimiento en cultivo parece haber estabilizado y reducido el número de éstas.

La distribución de cinetosomas en las cinetias y unas con respecto a otras en este clon llama la atención por su regularidad, quedando los cinetosomas en la parte anterior celular localizados al mismo nivel unos con respecto a otros, formando como una armadura regular de líneas paralelas. Todas las cinetias alcanzan el polo anterior, delimitando un claro casquete anterior, excepto la primera y última que quedan un poco por debajo del resto (Láminas 25 a, b, c y 26 a, c). Este casquete anterior es bastante más amplio que en cualquiera de las otros clones estudiados, donde las cinetias quedan muy apretadas unas junto a otras.

La primera posición cinetosómica de la primera cinetia queda al mismo nivel anterior que el resto o un poco por debajo de la primera posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas, casi a nivel de la segunda a veces, mientras que la primera posición cinetosómica de la última cinetia queda a nivel de la segunda posición cinetosómica del resto de las cinetias somáticas (Láminas 25 a y 26 a, c, e).

Las cinetias no alcanzan todas el polo posterior, pero las que llegan forman un círculo más o menos regular dejando un area libre de cinetosomas mayor que el observado en el polo anterior. La última cinetia es ligeramente más larga quedando casi conectada con el complejo basal del cilio caudal, como ocurrio en algunos de los otros clones estudiados. Mientras que la primera y segunda cinetias no llegan a alcanzar el círculo posterior, quedando uno o dos cinetosomas, respectivamente, sobre él. El resto de las cinetias somáticas terminan posteriormente de forma

irregular, al ser unas más cortas que otras de uno a dos cinetosomas (Láminas 25 a, b, c y 26 e, g). El polo posterior parece presentar numerosos mucocistos situados alrededor del complejo basal del cilio caudal como se pudo comprobar por medio de la impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff), lo que hace difícil la identificación de cinetosomas con esta técnica y, por tanto, la observación del final de las cinetias somáticas o del complejo basal (Lámina 26 d).

Las cinetias están compuestas por cinetosomas dobles en la mitad anterior celular, mientras que la mitad posterior porta cinetosomas sencillos (Lámina 25 b, c). Estos van acompañados siempre de un saco parasómico que queda entre ambos cinetosomas a su izquierda en el caso de cinetosomas dobles o sobre el cinetosoma sencillo ligeramente a su izquierda.

El número de posiciones cinetosómicas en cada cinetia varía entre quince y veintisiete en fase estacionaria de crecimiento y entre diecisiete y treinta en fase exponencial. La distribución por frecuencias se puede observar en la Figura 26. El número de posiciones cinetosómicas en la última cinetia en este clon parece ser mayor que el de la primera cinetia, y ambas mayores que el resto de las cinetias somáticas (Figura 26; Tabla 25).

Infraciliación bucal

La posición del area bucal está siempre a nivel del plano ecuatorial o ligeramente sobre él en células en fase exponencial (Láminas 25 a, b, c, 26 a, e y 27 b, d).

La policinetia 1 o M1 es muy pequeña cuando se compara con el tamaño celular. Esta policinetia no ciliada está constituida por dos líneas asimétricas de tres y dos o tres estructuras cada una como se observó en el caso de la impregnación con carbonato de plata amoniacal (Láminas 25

a, b, c y 26 a). La línea derecha queda un poco más abajo que la izquierda. Se observa, asimismo, con esta técnica, una estructura argentófila aislada un poco por debajo de M1, entre la parte anterior de M2 y la posterior de M1. Las observaciones con la impregnación con nitrato de plata, sin embargo muestran la presencia de una línea sencilla de tres cinetosomas, excepcionalmente cuatro (Lámina 26 e), lo cual hace pensar en la presencia de sacos parasómicos intercalados entre cinetosomas en esta policinetia que son observables con la impregnación argéntica de carbonato de plata amoniacal. La presencia de otra estructura ligeramente más abajo de la M1, observada con carbonato de plata amoniacal se observó, asimismo, con la impregnación con nitrato de plata y con protargol (Láminas 26 e y 27 b, d), lo cual puede prácticamente confirmar su naturaleza cinetosómica y no un artefacto como se pensó en un principio. Esta policinetia está situada en el área anterior de la célula entre las cinetias primera y última, a nivel de la tercera y cuarta posiciones cinetosómicas de la última cinetia somática. La primera y última cinetias somáticas en este clon en la parte anterior celular (sobre el área bucal) están muy cercanas, lo que en algunos casos hace difícil la observación de esta policinetia.

La policinetia 2 o M2 está constituida por dos líneas de seis cinetosomas más una línea muy corta de dos o tres cinetosomas, situada externamente - más alejada de la haplocinetia -. Esta policinetia está situada frente a las posiciones cinetosómicas décima y duodécima de la última cinetia somática (Láminas 25 a, b y 26 a, e; Figura 10).

La policinetia 3 o M3 está constituida por tres líneas en posición oblicua con respecto a la haplocinetia de cuatro, tres y dos cinetosomas, respectivamente.

La haplocinetia es bastante pequeña, considerando el tamaño celular y tiene una forma peculiar que delimita claramente los segmentos A y B. Está situada más o menos a nivel ecuatorial en la célula y aparece formada por una

línea de cinetosomas dobles en zig-zag de la que sólo la externa es ciliada, más una línea externa de sacos parasómicos normalmente visible con la impregnación con carbonato de plata amoniacoal (ver microscopía electrónica). La fila interior de cinetosomas en el segmento anterior A es tres cinetosomas más larga que la fila exterior y está constituida por ocho o nueve cinetosomas. El comienzo del segmento B está situado interiormente muy cercano a la polycineta M3 y, como en los otros casos, está constituido por once cinetosomas dobles. Se encuentra situada aproximadamente a nivel de las posiciones cinetosómicas décima y décimoquinta de la última cineta somática, comenzando anteriormente hacia el nivel de la mitad de la polycineta 2 o M2 (Láminas 25 a, b, 26 a, e y 27 b, d).

El segmento C de la haplocineta o vestigio del escutico se observó exactamente como aparece en la Figura 10. Fue difícil de identificar su composición, ya que únicamente fue observable en procesos de división y con la impregnación con carbonato de plata amoniacoal (Láminas 25 b, c y 26 a). En el caso de la impregnación con nitrato de plata suelen aparecer a su alrededor mucocistos con gran afinidad por las sales de plata lo cual hace difícil la identificación de los cinetosomas (Lámina 26 e). La composición, como en la mayoría los otros clones, es de tres cinetosomas dispuestos en los vértices de un triángulo invertido situado debajo del extremo posterior del segmento B de la haplocineta.

Aparato nuclear

El macronúcleo, observable con la técnica de carbonato de plata, tiene forma redondeada u oval y algunas veces ligeramente irregular, quedando situado en la parte central de la célula ligeramente desviado hacia la parte anterior. El micronúcleo, claramente visible, queda adosado anteriormente al macronúcleo. Ambos núcleos, en fase exponencial de crecimiento se observaron ligeramente

desplazados sobre el plano ecuatorial por el elevado número de vacuolas digestivas presentes en el citoplasma celular (Lámina 26 b).

La impregnación con nitrato de plata puso claramente de manifiesto en este clon las líneas argentófilas que no quedaron muy patentes en ninguno de los otros clones estudiados. Entre éstas se pueden observar, asimismo, otras estructuras que quedan impregnadas de forma muy clara en el recorrido de estas líneas entre cinetias, que probablemente sean mucocistos (Lámina 26 f).

El poro vacuolar se encuentra situado entre la primera y segunda cinetias somáticas, a nivel de sus últimos cinetosomas, más cercano a la segunda cinetia que a la primera. Dichas cinetias somáticas son siempre más cortas que el resto, como ya se ha indicado anteriormente (Lámina 25 a, b, c). Esta observación se realizó también con la impregnación de nitrato de plata (Lámina 26 g).

La impregnación con protargol en este caso pareció producir mejores resultados que en cualquiera de los otros clones estudiados. Aunque la ciliación somática fue observable, la identificación de cinetosomas fue, sin embargo, prácticamente imposible (Lámina 27 a, b, c, d).

La infraciliación bucal fue, asimismo, ligeramente visible, aunque de nuevo la identificación de cinetosomas no fue posible. Sin embargo, se pudo observar la policinetia 1 (M1) en algunos casos, siendo posible la identificación de la estructura argentófila debajo de ésta, como se observó en las otras impregnaciones, lo que casi asegura su naturaleza cinetosómica (Lámina 27 b, d).

El aparato nuclear aquí de nuevo presento una forma completamente distinta a la observada para el caso de la impregnación con carbonato de plata amoniacal y ligeramente encogida. La forma de este núcleo coincide más con la observada por medio de microscopía electrónica de

Microscopía electrónica de barrido

La densa ciliación en la parte anterior celular por la presencia de cinetosomas dobles, ambos ciliados como ya se ha observado también en los otros clones estudiados, así como además la cercanía de la primera y última cinetias, dificultó la observación de las estructuras del área bucal que en este clon parece ser más pequeña que en los otros casos estudiados. Aparecen, asimismo, numerosos mucocistos entre cinetosomas contiguos que parecen ser expulsados durante el proceso de fijación y deshidratación que dificultaron el estudio de las estructuras bucales. Los cilios pertenecientes a la polycineta 2 (M2), que en este caso no son tan largos como los observados para los otros clones estudiados, quedan en disposición perpendicular a la superficie celular, mientras que los cilios pertenecientes a la polycineta 3 (M3), que son ligeramente más cortos que los de la 2 (M2), quedan dirigidos como en los otros casos hacia la depresión que se forma en el área del citostoma, por lo tanto están dispuestos prácticamente paralelos a la superficie celular (Lámina 28 a, b).

La haplocinetia está constituida por los cilios pertenecientes a la línea de cinetosomas más externa de dicha estructura (Lámina 28 a, b), apareciendo los primeros cilios anteriores (segmento A de la haplocinetia) a nivel de la parte media de la polycineta 2 de la que queda separada aquí de nuevo por una cresta intermembranal. El segmento A de la haplocinetia está constituido por ocho cilios, mientras que el segmento B consta de diez u once.

Se pudieron observar, asimismo, la situación del poro de la vacuola contráctil (Lámina 28 d) y las estrías peliculares en la superficie celular que coinciden exactamente con la situación de las líneas argentófilas observadas por medio de la impregnación con nitrato de

plata (Láminas 26 f y 28 e). Estas líneas por ejemplo se pueden observar bajo la haplocinetia (Lámina 28 a, b), exactamente en la situación del segmento C de la haplocinetia, como ya se observó en el caso de la impregnación con nitrato de plata (Lámina 28 f), donde se situa el vestigio del escutico, continuandose con el citopigio y conectando con la parte posterior de las cinetias somáticas (hacia la primera cinetia somática) (Lámina 28 d). Algunas de las líneas argentófilas observadas con la impregnación de nitrato de plata entre cinetias contiguas (Lámina 26 f) se pudieron observar en este caso en células en las que durante el tratamiento se había perdido parte de la película (Lámina 28 e), dejando ver que dichas líneas parecen coincidir con parte de los limites de las vesículas alveolares.

El vestigio del escutico al no ser ciliado excepto en aquellas células en proceso de estomatogénesis, no se pudo observar como tal, sin embargo en el area exactamente debajo del final del segmento B de la haplocinetia, aparecen regularmente tres poros (Lámina 28 f), situados en forma de triángulo invertido y conectados con estrías observables superficialmente de la misma manera que se observó con la utilización de impregnaciones. En este caso, como en algunos clones previamente descritos, aparecen en dicha area mucocistos que son expulsados durante el tratamiento de fijación y deshidratación de las células.

La presencia constante ya observada en los otros clones estudiados de crestas o repliegues de membrana entre las posiciones de la policinetia 1 (M1) y a ambos lados de la 2 (M2) (Lámina 28 a, b) se volvió a repetir para este clon. Estas estructuras forman una "Y" invertida sobre el area de las policinetias 1 y 2 (M1 y M2). Tres de éstas crestas aparecen en la zona donde debe estar situada la policinetia 1 - no ciliada -, donde dos de estas, que son de mayor tamaño, aparecen en línea y un repliegue menor entre aquéllas y a su izquierda, como ocurrió en el clon de U.marinum. Más abajo y a ambos lados de la policinetia

2 (M2), aparecen otras dos crestas, una entre la haplocinetia y la propia policinetia 2 y otra a la derecha de ella (externamente), ambas parecen ser de una longitud similar a la propia policinetia (Lámina 28 a, b). Otra cresta pero mucho más reducida parece situarse bordeando externamente a la haplocinetia.

El polo anterior celular se pudo observar claramente en este clon, casi plano y ligeramente inclinado hacia la parte dorsal celular como ya se había observado en las células en vivo (Lámina 28 c).

Microscopía electrónica de transmisión

La infraciliación somática está constituida por cinetias con cinetosomas dobles anteriormente y sencillos posteriormente como se observó, asimismo, en el estudio por medio de impregnaciones con plata y en microscopía electrónica de barrido (Lámina 29 a, b). Los cinetosomas presentan fibras cinetodésmicas asociadas muy largas que casi se superponen a las de los cinetosomas inmediatamente anteriores (Lámina 29 d). Las bandas postciliares y transversas, como en el caso de U. marinum, están compuestas por cuatro microtúbulos en paralelo (Lámina 29 a, b). Los cinetosomas presentan asociado un saco parasómico, que en el caso de los cinetosomas dobles se situa exactamente entre ellos a su izquierda y en el caso de los sencillos sobre el cinetosoma y ligeramente desviado hacia la izquierda (Láminas 29 a, b, d y 30 f).

El condrioma en este clon está formado por mitocondrias gigantes de crestas tubulares que recorren la zona subpelicular entre meridianos de un extremo al otro de la célula (Láminas 29 a, b, d y 30 f), aunque en este clon algunas de las mitocondrias parecen ramificarse hacia el interior celular, siendo más irregulares (Lámina 30 d, e) que en los otros casos estudiados. Estas parecen conectar directamente con el retículo endoplásmico rugoso

El área bucal se pudo observar en secciones tangenciales en casi todos sus tramos (Lámina 31 a, b, c, d, e). La policinetia M1 está compuesta principalmente por tres cinetosomas, entre los que se intercalan al menos dos sacos parasómicos, como se intuyó por medio de la utilización de las impregnaciones de carbonato de plata amoniacoal y de nitrato de plata (Lámina 31 a, b). Esta es la razón por la que por medio de la impregnación se pueden observar dos líneas de estructuras, ya que los sacos parasómicos quedan impregnados también, mientras que en la impregnación con nitrato de plata sólo aparece una línea. La otra estructura argentófila que queda un poco más abajo de esta policinetia impregnada no se pudo observar en este caso.

La policinetia M2 se observó en sección tangencial a distintos niveles. Está constituida por tres líneas de seis cinetosomas y una de dos, composición que se observó por medio de las impregnaciones (Lámina 29 d,e). Además parece presentar sacos parasómicos asociados, los cuales se pudieron observar a distintos niveles en las secciones ultrafinas, uno entre las dos líneas de seis cinetosomas (Lámina 31 a, c) y otros tres situados en el extremo posterior de la policinetia. Se pudo comprobar que los cinetosomas anteriores de las dos líneas de seis cinetosomas en esta policinetia no son ciliados (Lámina 31 a, c).

La policinetia M3, que como en los otros casos parece quedar incluida en la depresión del citostoma, fue por dicha causa difícil de observar, aunque su composición cinetosómica parece ser similar a la observada por medio de las impregnaciones, puede que sea mayor (Lámina 31 c, d).

Las policinetias 2 y 3 (m2 y M3) quedan tan cercanas entre ellas y la haplocinetia que no es sorprendente la

dificultad encontrada en su resolución por medio de las impregnaciones argénticas (Lámina 31 a, c, d).

La haplocinetia constituída por una línea de cinetosomas dobles dispuestos en zig-zag de la que sólo es ciliada la externa (Lámina 31 a, c, d), presenta una línea externa de sacos parasómicos asociados, como se observó asimismo en los otros casos estudiados (Lámina 31 d). En algunos de los cilios se pudieron observar lo que se han denominado por algunos autores como inclusiones paraxonémicas (Rodrigues-de-Santa-Rosa, M. y Puytorac, P.D., 1976).

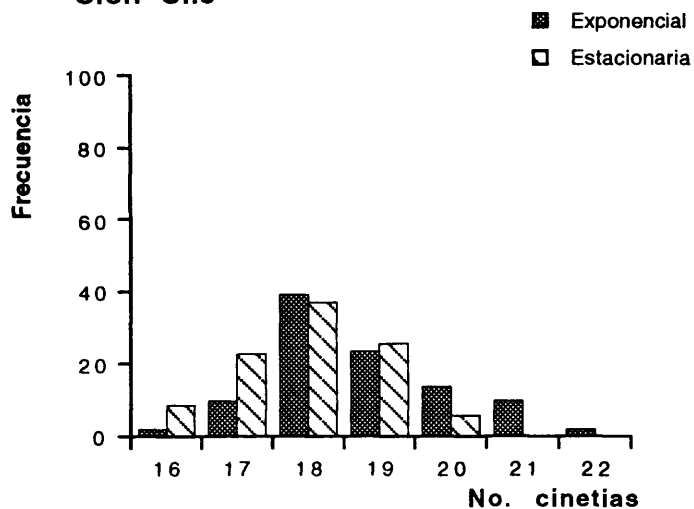
Las crestas observadas por medio de microscopía electrónica de barrido se pudieron observar en algunos casos en sección tangencial, mostrando una de las crestas laterales de la policinetia 2 (Lámina 31 a, c) que queda entre ésta y la haplocinetia. Dicha cresta parece continuarse posteriormente hasta el nivel de la policinetia 3, extremo que no pudo comprobarse por medio de microscopía electrónica de barrido.

El aparato nuclear, constituído por un macronúcleo y un micronúcleo, como ya se observó en el caso de la utilización de impregnaciones argénticas, fue similar al observado en otros estudios sobre Uronema (Kaneshiro and Holz, 1976). El macronúcleo presenta nucleolos granulares en la perifería que parecen sobresalir en algunos casos de la superficie nuclear bajo la membrana. Estos parecen ser menos numerosos que los observados en el caso de U.marinum. También aparecen numerosos cuerpos cromatínicos dispersos en la matriz nuclear. El micronúcleo no presenta nucleolos y sólo se puede observar la cromatina en distintos grados de condensación. La membrana externa del macronúcleo y micronúcleo son continuas y parecen continuarse con el retículo endoplásmico rugoso (Lámina 31 a).

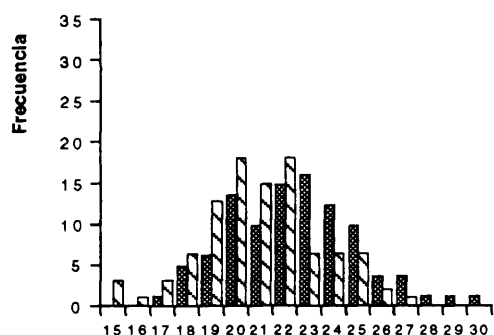
Los mucocistos que aparecen frecuentemente en la región cortical entre cinetosomas adyacentes en las

cinetias o entre cinetias, presentan la misma estructura observada en otros estudios en Uronema (Kaneshiro and Holz, 1976) (Lámina 30 b, c).

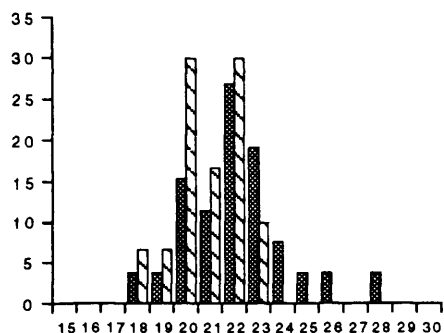
Clon Cil3



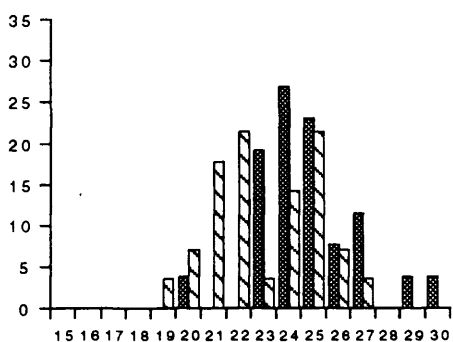
No. cinetosomas/cinetia



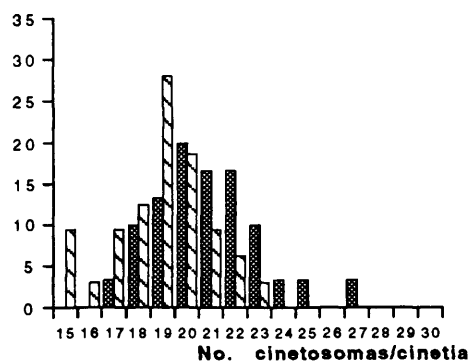
Primera cinetia



Ultima cinetia



Otras cinetias



Füüura 26.-

Distribución por frecuencias del número de cinetias somáticas y el número de cinetosomas por cinetia (a.- en total, b.- en la primera cinetia, c.- en la última cinetia d.- en otras cinetias) del clon Cil3 en ambas fases de crecimiento.

Este clon fue aislado de una muestra procedente de una planta piloto de tratamiento de aguas residuales de RZM³ tomada en Marzo de 1991 en el NHM⁴.

Microscopía óptica

El comportamiento de las células *in vivo* pertenecientes a este clon es similar al observado para el clon referencia U. marinum, aunque parece que en las células de SRBM se mueven más despacio. La forma celular, similar también, tiende a ser más redondeada que en los casos citados, y el casquete anterior más pronunciado que en los ciliados marinos perteneciente a este morfotipo e inclinado de nuevo hacia la región dorsal celular (Figura 12).

Infraciliación somática

Este clon presenta mayoritariamente doce cinetias somáticas en ambas fases de crecimiento, aunque se observaron células con trece cinetias en mucha menor frecuencia (Figura 27).

Las cinetias presentan pares de cinetosomas con un saco parasómico a la derecha de ambos y entre ellos, aunque a veces la impresión en este clon fue de presencia de dicinetias completas en los meridianos, este extremo se descartó como se verá más adelante gracias al estudio con microscopía electrónica de transmisión.

La primera cinetia somática queda un poco por debajo del círculo anterior que delimita el casquete anterior

³ Root Zone Method de Kickuth

⁴ Natural History Museum. Londres. Inglaterra.

celular. Su primera posición cinetosómica está ocupada por un cinetosoma seguido por un par (Lámina 32 a, c, d). La última cinetia comienza una posición cinetosómica más abajo que la primera cinetia. Su primer par de cinetosomas está tan cerca de la primera posición cinetosómica de la primera cinetia, que algunas veces es difícil identificar la cinetia a la que corresponde.

El polo posterior celular queda delimitado por las cinetias somáticas, que en este clon no terminan todas al mismo nivel sino irregularmente. La última cinetia es una posición cinetosómica más larga que el resto, mientras que la primera cinetia es una posición cinetosómica más corta (Lámina 32 d, e, f). El complejo basal del cilio caudal en el polo posterior de la célula aparece más impregnado que en el caso de los otros cinetosomas, lo cual puede ser debido a la deposición de la sales de plata en una ligera depresión formada en la zona de inserción del cilio caudal, más la presencia de dos sacos parasómicos, citados por otros autores, en esa zona, aunque en este trabajo no se han podido observar.

Las fibras cinetodésmicas en este clon suelen aparecer muy bien teñidas con la impregnación con carbonato de plata amoniacoal formando al superponerse unas con otras como una línea continua a la izquierda de la cinetia (Lámina 32 c).

El número de posiciones cinetosómicas por cinetia en este clon se encuentra entre once y veintiuna en fase exponencial de crecimiento o entre once y diecinueve en fase estacionaria (Figura 27; Tabla 25).

Infraciliación bucal

La observación de las estructuras de la infraciliación bucal se hizo muy difícil en este ciliado debido a la impregnación de las vacuolas alimenticias, así como otras estructuras no identificadas en el citoplasma celular.

La polycinetia 1 o M1 queda muy cerca de la última cinetia lo que hace muy difícil su observación. La polycinetia M1 está formada por seis cinetosomas regularmente espaciados, estando el central (el tercero empezando por la parte anterior de M1) ligeramente desviado hacia la derecha - hacia la ultima cinetia -, presentando forma de llave (}) (Lámina 32 a, d). Su posición no es paralela a la última cinetia, sino ligeramente oblícua con respecto a ella, parece sin embargo estar alineada con el resto de las otras polycinetias M2 y M3 y la haplocinetia. Está localizada justo en frente de la primera y segunda posiciones cinetosómicas de la última cinetia somática, a veces alcanza la tercera posición cinetosómica (Lámina 32 a, c, d).

La polycinetia 2 o M2 está formada por tres líneas paralelas, dos de las cuales presentan cuatro o cinco cinetosomas cada una, mientras que la tercera y más externa es uno o dos cinetosomas más corta anteriormente. Está localizada frente a la cuarta y quinta posiciones cinetosómicas de la última cinetia somática. El extremo anterior de la haplocinetia queda más o menos situado a nivel medio de esta polycinetia (Lámina 32 a, d, e, f).

La polycinetia 3 o M3 está formada por tres líneas de tres, dos y un cinetosomas, respectivamente, dispuestas oblícuamente con respecto a la polycinetia M2. La fila interior de esta polycinetia, esto es, la más cercana a la haplocinetia parece estar conectada con ella en algunas de las células observadas.

La haplocinetia está formada, en toda su longitud, por una línea de cinetosomas dobles dispuestos como en los otros casos en zig-zag. La presencia de una tercera fila externa de estructuras también se observó en este clon. Esta tercera línea se corresponde con una línea de sacos parasómicos, conclusión a la que se llegó después del estudio por medio de microscopía electrónica de transmisión. El segmento A de esta presenta aproximadamente

siete cinetosomas dobles, mientras que el segmento B presenta once (Lámina 32 a, c, d, e, f).

El segmento C de la haplocinetia o vestigio del escutico presenta la misma estructura observada en los otros casos de tres cinetosomas dispuestos en los vértices de un triángulo invertido debajo del extremo posterior del segmento B de la haplocinetia.

Aparato nuclear

El macronúcleo, a diferencia de los clones marinos aislados, está localizado en la mitad anterior de la célula, enmascarando normalmente en las tinciones las policinetias M2 y M3. Sí deja ver, sin embargo, la parte final de la haplocinetia y de la policinetia M2. El macronúcleo no suele tener exactamente forma oval, al menos en la tinción de carbonato de plata amoniacal, sino tronco cónico o de cono, estando la parte más estrecha dirigida hacia la parte apical de la célula donde queda localizado prominentemente el micronúcleo. Su contorno es a menudo irregular y muy granular (Lámina 32 b, c, d, h). El micronúcleo es redondeado y queda adosado anteriormente al macronúcleo.

El poro de la vacuola contráctil está situado al final de la segunda cinetia somática y queda como conectado por una línea argentófila que viene desde la última posición cinetosómica de la primera cinetia somática y del citopigio (Lámina 32 e, f).

El citopigio queda situado entre la primera y última cinetias somáticas, entre el segmento C de la haplocinetia y la última posición cinetosómica de la última cinetia somática.

Estos ciliados cuando fueron mantenidos por más de tres semanas sin añadir el stock de bacterias (V.

natriegens), las células disminuían mucho en tamaño, tomando el aspecto de lo que Fenchel ha denominado "swarmers" (Fenchel, T., 1990) o larva. Después de teñidas con carbonato de plata, estas células presentan un macronúcleo muy grande que ocupa, casi toda la mitad anterior celular, a veces, la mayor parte de la célula, probablemente debido a disminución del tamaño celular mientras el tamaño del macronúcleo permanece constante. El tamaño de la boca con respecto al tamaño celular es desmesuradamente grande, ocupando a veces casi toda la parte ventral celular.

Se observaron procesos de conjugación. Las células que formaban parte de estos procesos, eran mucho más pequeñas que el resto de las células en fase exponencial de crecimiento, con un macronúcleo muy grande. Normalmente aparecieron en cultivos no alimentado durante más de dos semanas.

El condrioma, a diferencia de los clones marinos, fue claramente visible entre meridianos con la impregnación con carbonato de plata amoniacal.

La impregnación con protargol, como se puede observar en la Lámina 32 g, h, no produjo resultados de calidad suficiente para su estudio posterior.

Microscopía electrónica de transmisión

El citoplasma celular de este clon visto en microscopía electrónica presenta gran densidad de ribosomas lo cual hace en muchos casos difícil la observación de otras estructuras.

Las vacuolas alimenticias parecen presentar una estructura distinta a la observada para los clones marinos estudiados, sobre todo en cuanto a los estados de degradación de las bacterias de las que se alimentan.

El examen de secciones ultrafinas por medio de microscopía de transmisión permitió la determinación correcta de la composición a nivel ultraestructural de la infraciliación somática que resultó dudosa durante el estudio por medio de impregnaciones argénticas. Las cinetias somáticas están compuestas tanto por cinetosomas dobles en la parte anterior celular, como sencillos en la posterior (Lámina 33 a, b). La disposición de sacos parasómicos fue similar a la observada para los otros casos estudiados, esto es, los pares de cinetosomas anteriores presentan un saco parasómico asociado a ellos que queda situado entre los dos cinetosomas, a su izquierda sobre la posición de la fibra cinetodésmica que se dirige hacia adelante y queda también a la izquierda de los cinetosomas (Lámina 33 a) y los cinetosomas sencillos presentan el saco parasómico situado anteriormente al cinetosoma y ligeramente desviado a la izquierda (Lámina 33 a, b).

Los cinetosomas y algunas de las fibras asociadas, como las fibras cinetodésmicas, las bandas de microtúbulos o fibras postciliares y transversas, ambas compuestas por seis microtúbulos se pueden observar en la Lámina 33 a, b, c y d. Las fibras transversas de los cinetosomas de las cinetias somáticas se pueden observar también en la Lámina 33a, b. Los numerosos mucocistos (Lámina 33 c) situados normalmente entre posiciones cinetosómicas contiguas o entre cinetias que suelen quedar impregnados con la utilización de ciertas tinciones como con nitrato de plata o el caso de protargol, se pueden observar claramente en algunos de las secciones (Láminas 33 d y 34 a, b). Los cinetosomas presentaron una matriz en la región central del cinetosoma (Lámina 33d).

Las cinetias, como en los otros clones, están rodeadas por las mitocondrias gigantes de crestas tubulares que forman parte del condrioma. Estas en este clon fueron claramente visibles en las impregnaciones con carbonato de plata amoniacoal, como se han observado en otros estudios en Uronema proveniente de muestras de agua dulce (Téllez,

La composición de las estructuras bucales en este clon no fue posible, excepto por la haplocinetia de la que se pudieron observar algunas secciones tangenciales completas (Lámina 34 a, b). La línea externa de cinetosomas que es la única ciliada, presenta una línea externa de sacos parasómicos, que es la tercera línea de estructuras observadas por medio de la impregnación con carbonato de plata. Se pueden observar, asimismo, las fibras postciliares situadas hacia la región del citostoma.

La composición de la policinetia 2 (M2) se pudo observar parcialmente en varios cortes de lo que se pudo deducir que su composición cinetosómica correcta es de tres líneas de seis, seis y cinco cinetosomas, respectivamente (Lámina 34 a, c, d). Aparecen, además, varios sacos parasómicos dispuestos irregularmente entre los cinetosomas lo que puede inducir a errores en el caso de la utilización de las impregnaciones, ya que estos quedan teñidos también.

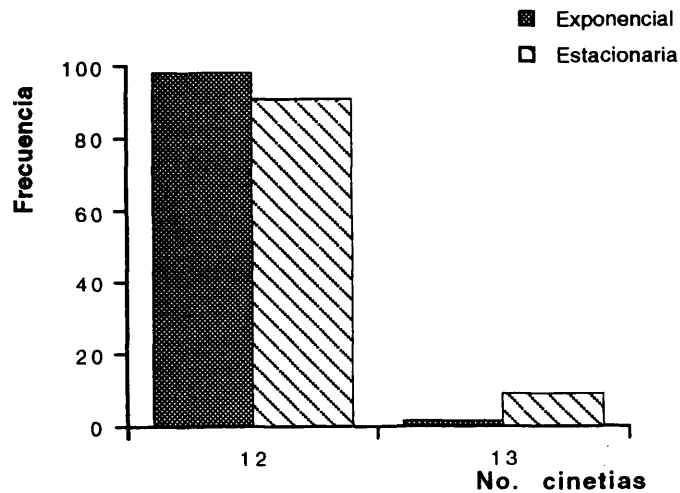
La composición de la policinetia 3, que en las impregnaciones es muy difícil de determinar, parece ser un cinetosoma más que los observados en el caso de las impregnaciones. Así, está compuesta por una línea de cuatro cinetosomas, una de tres, una de dos y un cinetosoma en el extremo (Lámina 34 a, b). Su posición no es paralela a la superficie como ocurre con la policinetia 2 (M2), sino que queda inclinada hacia el interior celular en la hendidura del citostoma (Lámina 34 c, e), forzando a los cilios que porta a cubrir dicha área, situación que concuerda con la observada en el estudio con microscopía electrónica de barrido en los otros clones. Esta podría ser una de las causas de la dificultad para su observación por medio de impregnaciones, incluso con carbonato de plata amoniacal.

La haplocinetia se puede observar en varios de sus tramos en la Lámina 34 b, d y e. Está constituida por una línea de cinetosomas dobles dispuestos en zig-zag de la que

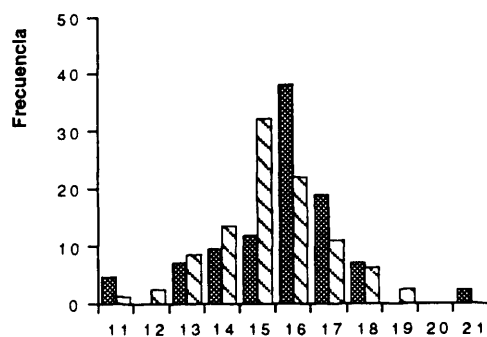
sólo la línea externa de cinetosomas es ciliada. El segmento A de la haplocinetia está constituido por siete cinetosomas dobles y el B por diez cinetosomas dobles. Externamente a esta línea de cinetosomas existe una línea de sacos parasómicos que parece corresponderse con la línea externa que se observó impregnada con la técnica de carbonato de plata amoniacal. La línea interna de cinetosomas, no ciliada, presenta posteriormente a cada uno de los cinetosomas regularmente una línea de fibras postciliares (Lámina 34 b). Las inclusiones paraxonémicas (Rodriguez-de-Santa-Rosa and Puytorac, 1976) observadas en el clon anterior fueron claramente visibles en algunos de los cilios posteriores del segmento B de la haplocinetia.

La Lámina 34 c, muestra una sección longitudinal de parte de las polycinetias M2 y M3. De nuevo, se puede observar cómo la orientación de los cinetosomas en M3 dispone los cilios cubriendo el área del citostoma.

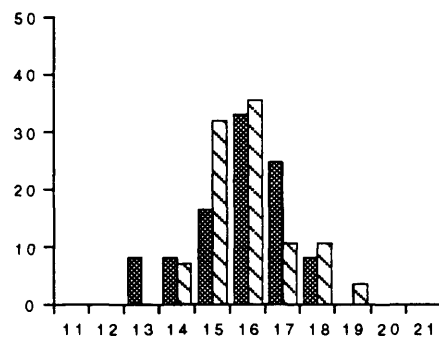
Clon SRBM



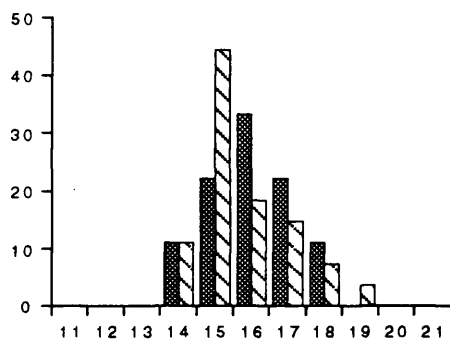
No. cinetosomas/cinetia



Primera cinetia



Ultima cinetia



Otras cinetias

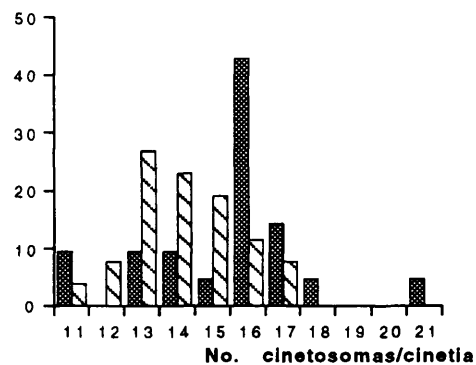


Figura 27.-

Distribución por frecuencias del número de cinetias somáticas y el número de cinetosomas por cinetia (a.- en total, b.- en la primera cinetia, c.- en la última cinetia d.- en otras cinetias) del clon SRBM en ambas fases de crecimiento.

Este clon fue aislado de una muestra procedente de las balsas de aireación de la planta de tratamiento de aguas residuales de fangos activos de Morden (Londres) recogida en Marzo de 1991.

Microscopía óptica

El comportamiento de las células *in vivo* es similar al observado para el clon SRBM. La forma celular, similar también, tiende a ser más redondeada que en la mayoría de los clones marinos estudiados, con el casquete anterior celular más pronunciado e inclinado hacia la región dorsal celular (Figura 12).

Infraciliación somática

Este clon de agua dulce presenta mayoritariamente 12 cinetias en fase exponencial de crecimiento y 13 en fase estacionaria. En ambas fases se observaron células con once cinetias pero con menor frecuencia (Figura 28). En este caso, todas las cinetias presentaban anteriormente pares de cinetosomas con un saco parasómico a la derecha de ambos y entre ellos. La parte posterior de las cinetias presenta cinetosomas sencillos.

La primera y última cinetias, como en el caso del clon SRBM, no alcanzan el círculo anterior delimitado por el resto de las cinetias somáticas, quedando una y dos posiciones cinetosómicas, respectivamente, por debajo del resto de las cinetias somáticas (Lámina 35 a).

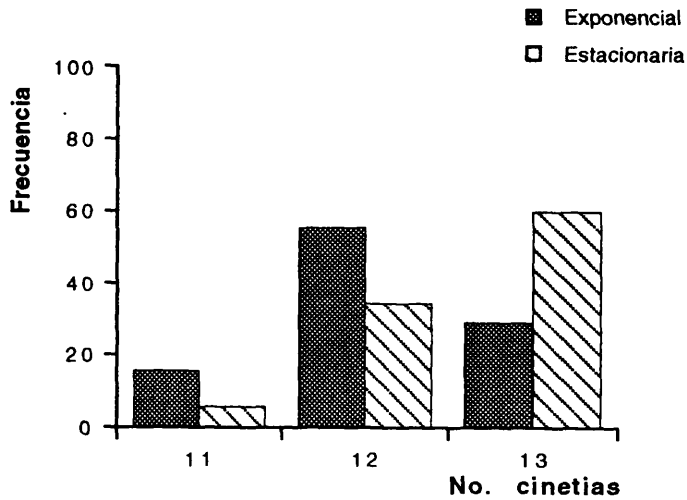
La primera posición cinetosómica de la primera cinetia somática presenta un cinetosoma sencillo más un par, como ocurrió en SRBM y la mayoría de los clones marinos.

células disminuían mucho en tamaño. El núcleo era grande y ocupaba la mayor parte del área anterior celular. La boca también era desmesuradamente grande.

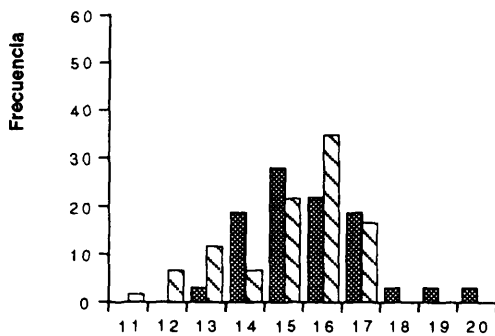
El condrioma apareció muy visible en casi todas las impregnaciones, situado entre las cinetias somáticas, a lo largo de toda la célula. Esto, junto con la impregnación intensa de diversas estructuras no identificadas y vacuolas en el interior celular, hicieron muy difícil la observación de la infraciliación (Lámina 35 b).

La impregnación con protargol (Lámina 35 e, f, g, h) no produjo resultados de calidad suficiente para ser utilizados en el estudio morfológico. El núcleo, sin embargo, parece confirmar las observaciones de posición y forma observadas por medio de la impregnación con carbonato de plata amoniacal.

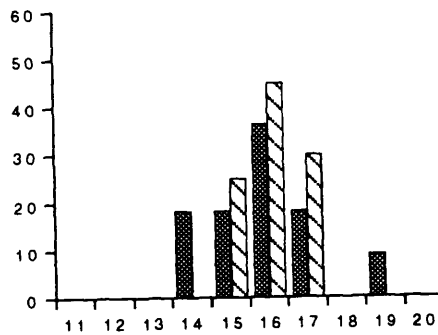
Clon Scut2.1



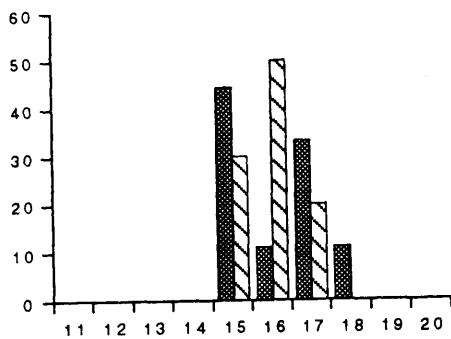
No. cinetosomas/cinetia



Primera cinetia



Ultima cinetia



Otras cinetias

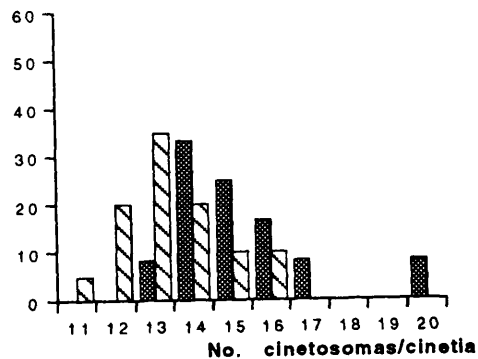


Figura 28.- Distribución por frecuencias del número de cinetias somáticas y el número de cinetosomas por cinetia (a.- en total, b.- en la primera cinetia, c.- en la última cinetia d.- en otras cinetias) del clon SCut2.1 en ambas fases de crecimiento. .

	Primera	Ultima	Otra	Media	Primera	Ultima	Otra	Media
U.m	20.13	18.68	18.36	19.05	18.29	17.09	16.13	18.76
U.s	20.91	19.74	17.19	19.34	19.38	17.59	14.60	17.43
X2	17.28	16.67	17.47	17.26	18.20	16.35	14.50	16.14
Ta	19.94	18.39	19.38	19.22	20.25	17.94	18.44	18.80
AD2	17.17	16.71	17.28	17.03	17.25	17.19	16.34	16.86
AE21	17.60	17.00	17.83	17.50	17.55	16.20	15.52	17.46
Cil1	21.00	19.83	19.48	19.97	20.07	19.22	17.89	18.70
BBcil	18.73	17.48	17.25	17.76	17.94	16.95	16.76	17.10
Cil7	22.22	20.33	19.91	20.60	20.65	18.46	18.43	18.83
AD1	15.90	16.00	14.17	15.00	15.50	15.00	14.42	14.88
AE22	14.67	14.60	14.19	14.43	13.89	15.50	15.11	14.92
SRBM	15.83	16.00	15.48	15.69	15.96	15.74	14.12	15.12
SC21	15.91	16.11	15.25	15.72	16.05	15.90	13.40	15.12
P.a	25.08	22.85	21.63	23.60	24.31	22.64	21.43	22.62
Cil3	22.15	24.81	20.90	22.48	20.87	23.00	18.91	20.93
Swil	19.09	17.22	17.88	18.08	19.10	17.70	16.96	17.72

Tabla 25.- Valores medios de número de cinetias en la primera, última y otras cinetias en ambas fases de crecimiento.

4.2. Estudio de las cinéticas de crecimiento

El estudio de las curvas de crecimiento para cada clon se llevó a cabo como medio para la observación de parámetros significativos de crecimiento y como punto de comparación entre los diferentes clones estudiados a unas determinadas condiciones de cultivo comunes a todos ellos.

4.2.1. Curvas de crecimiento: Diferencias entre los clones

El estudio de las curvas de crecimiento produjo resultados reproducibles en todos los casos en cultivo estático (en batch y en agitación, tanto en los casos de los clones marinos como en los de agua dulce. Los cultivos con los clones de agua dulce, a diferencia de los marinos en los que nunca ocurrió, mostraron la aparición de flóculos de bacterias que en algunos casos se han citado en otros trabajos con Uronema en cultivo estático (en batch) (Hamilton, R.D. y Preslan, J.E., 1969).

La utilización de un período de incubación previa en el cultivo utilizado como inóculo y llevada a cabo a la misma temperatura utilizada durante los experimentos, evitó la posible influencia en los resultados de cualquier efecto de shock térmico sobre los clones. Los cultivos inóculo fueron utilizados en fase de crecimiento estacionaria temprana (aproximadamente 48 horas) tratando de evitar en lo posible el alargamiento excesivo de la fase de latencia (Parker, J.G., 1976) (Figura 29). Se obtuvieron de esta manera y como se puede observar en todas las curvas de crecimiento estudiadas, fases de latencia menores o iguales a 10 horas, tras las cuales las células se encontraban inmediatamente en fase exponencial o logarítmica de crecimiento (Lámina 1).

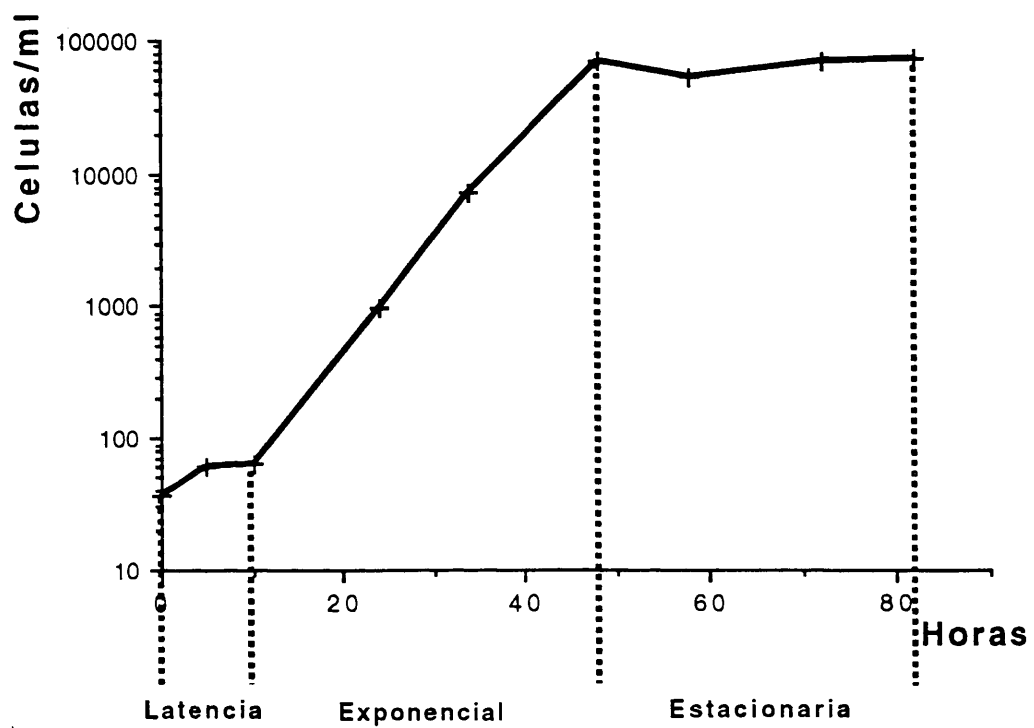


Figura 29.- Fases de la curva de crecimiento.

Las células, en todos los clones estudiados, una vez dispuestas en cultivo agitado incrementaron su tamaño de dos a seis veces al final de la fase de latencia, que como ya se ha indicado no solía ser más larga de 10 horas (Tabla 2). El tamaño volvió a reducirse al mismo tamaño observado en las células inóculo en aquélla fase de la curva de crecimiento entre el final de la fase exponencial y principio de la fase estacionaria. Estos cambios en tamaño fueron patentes en el aspecto del citoplasma celular, en el que aparecieron numerosas vacuolas esféricas y opacas que llenaban el citoplasma justo al final de la fase de latencia. Este aspecto de células vacuoladas se mantuvo durante todo el tiempo que duró la fase exponencial. Las numerosas vacuolas digestivas desaparecieron al final de dicha fase y principio de la fase estacionaria, siendo observable en estos casos, una o dos vacuolas en el citoplasma celular únicamente.

Las curvas de crecimiento obtenidas aparecen de la Figura 30 a la 38. Las fases exponenciales en la mayoría de los clones presentaron una duración entre 24 y 53 horas. Las células durante esta fase presentaron el mayor volumen celular (Lámina 1 b), y fue en esta parte de la curva, donde se tomaron las medidas de células en vivo o tras la aplicación de impregnaciones: carbonato de plata amoniacal, nitrato de plata y protargol. Los muestreos en la fase estacionaria se llevaron a cabo sobre el área de la curva que corresponde a la fase temprana de ésta, al menos entre 16 o 24 horas, tras lo cual se consideró concluída la fase exponencial.

CLON	EXPONENCIAL	ESTACIONARIA
<i>U. marinum</i>	6200.79±1919.14	1266.70±364.51
<i>U. schewiakoffi</i>	7919.20±2746.17	1796.90±531.12
<i>P. acutum</i>	3639.91± 877.02	1317.68±309.93
X2	2674.46± 602.79	591.02±210.98
Ta	4442.81±1012.01	724.50±167.22
AD1	1756.21± 441.70	847.10±209.73
AD2	2401.82± 570.10	831.42±309.10
AE21	3085.98± 872.11	988.11±324.36
AE22	3975.10± 803.15	1440.84±320.43
SWi1	3787.93± 969.60	1032.36±293.04
Cil1	2813.85± 638.52	958.51±259.70
BBCIL	3324.65± 901.85	1124.64±295.79
Cil7	2345.73± 528.84	725.65±136.18
Cil3	7212.86±2124.26	2210.53±661.45
SRBM	3326.89±1055.42	1411.40±327.50
SC21	3822.11± 784.09	1222.58±258.87

Tabla 2.- Volumen celular (μm^3) en fases exponencial y estacionaria *in vivo*

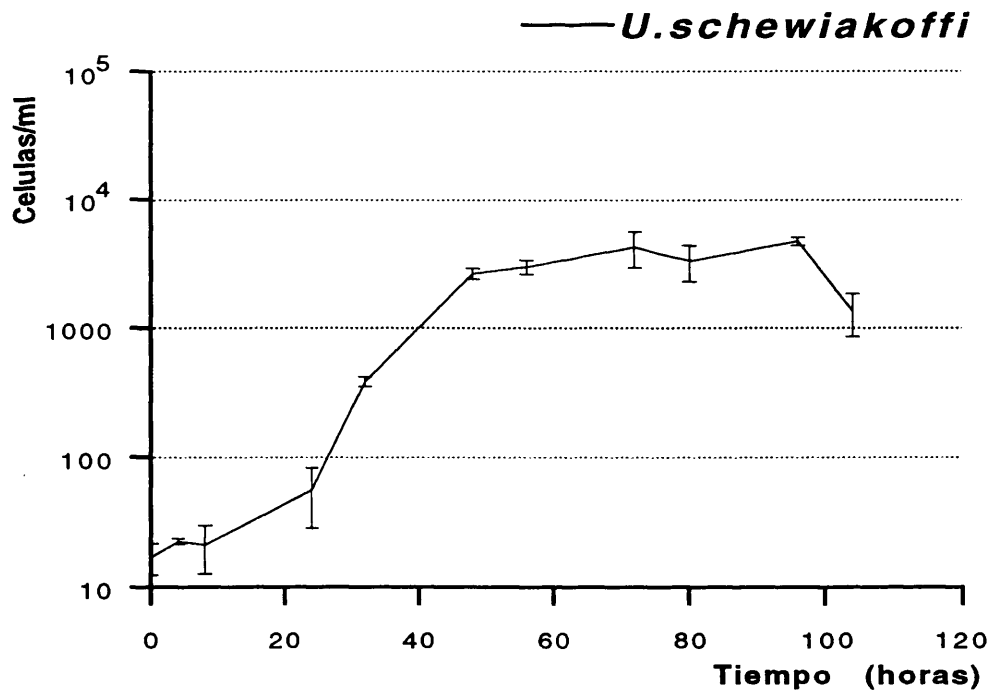
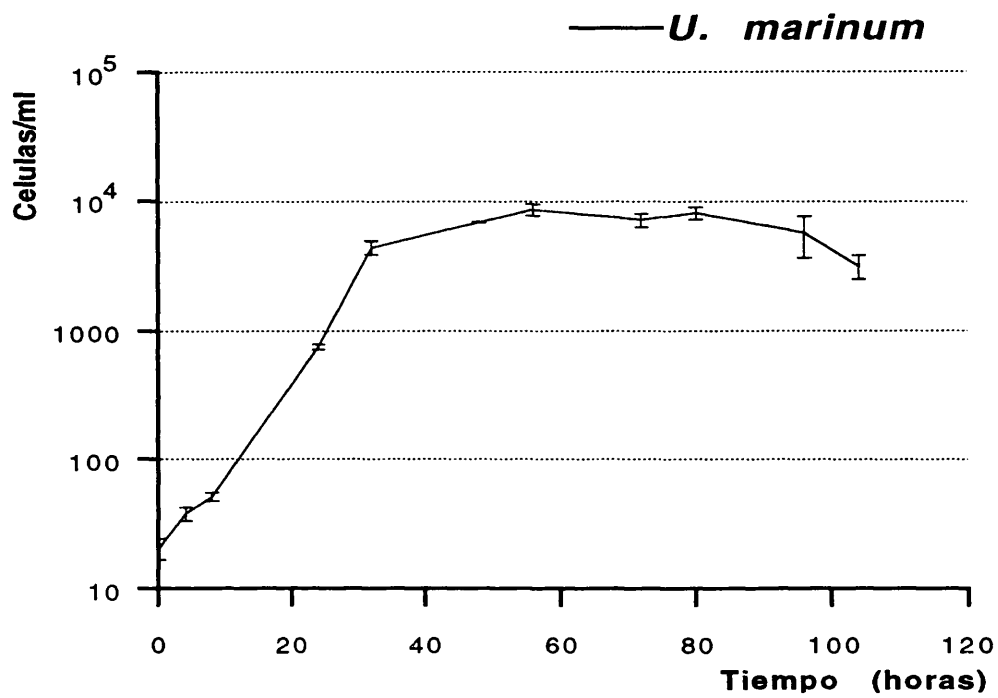


Figura 30.- Curvas de crecimiento de los clones *U. marinum* (CCAP 1986/2) y *U. schewiakoffi* (CCAP 1986/1) en cultivo monoxénico con *Vibrio natriegens* NCIMB#857: morfotipo 1.

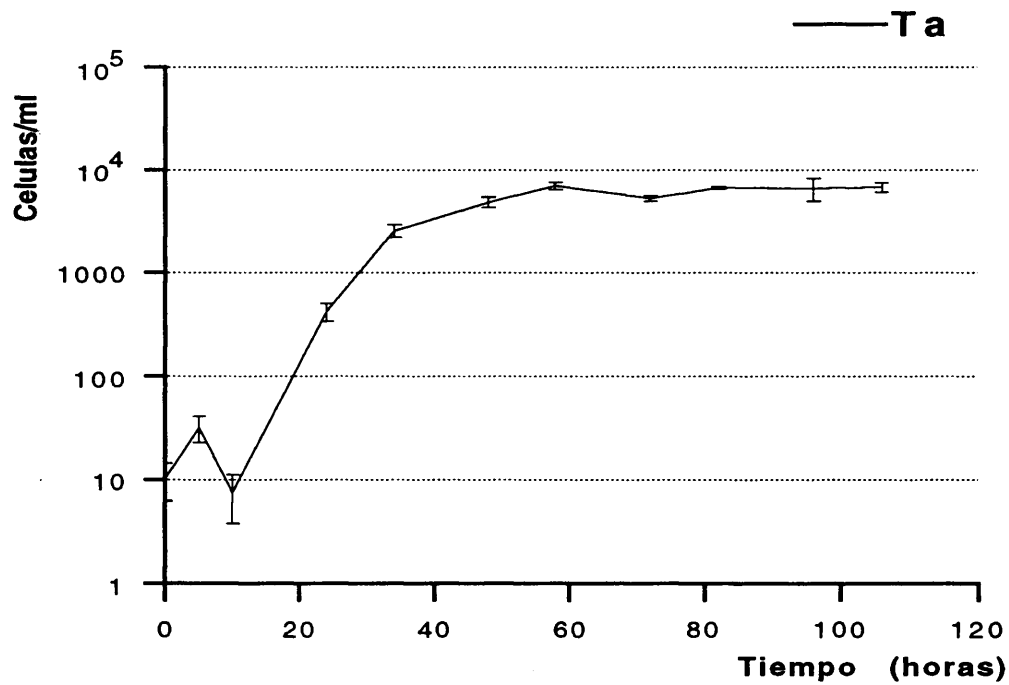
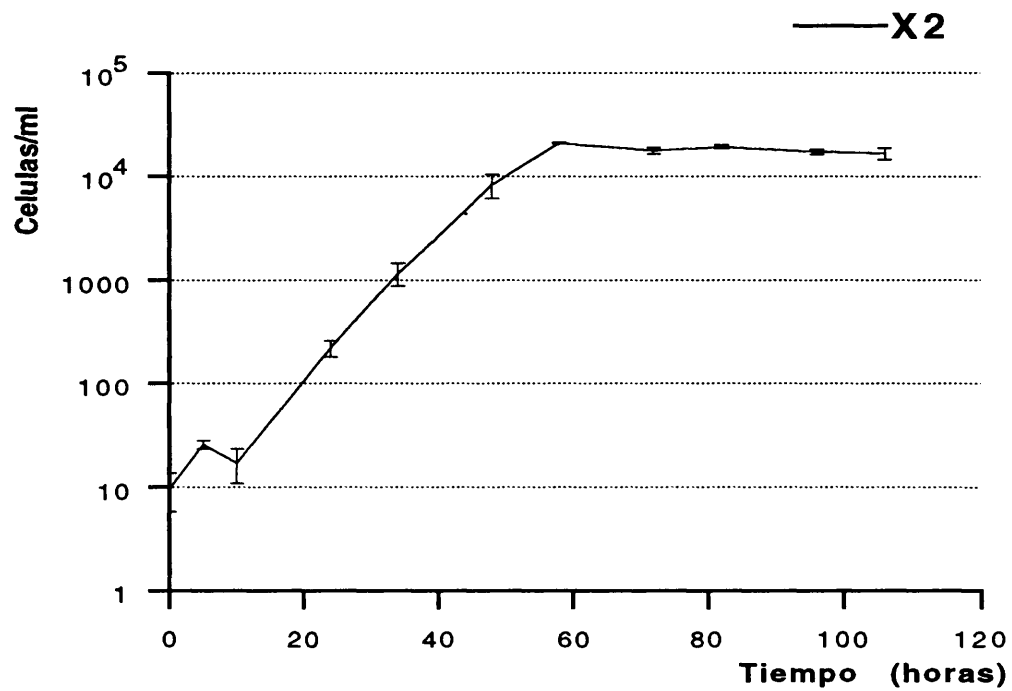


Figura 31.- Curvas de crecimiento de los clones X2 y Ta en cultivo monoxénico con *Vibrio natriegens* NCIMB#857: morfotipo 1.

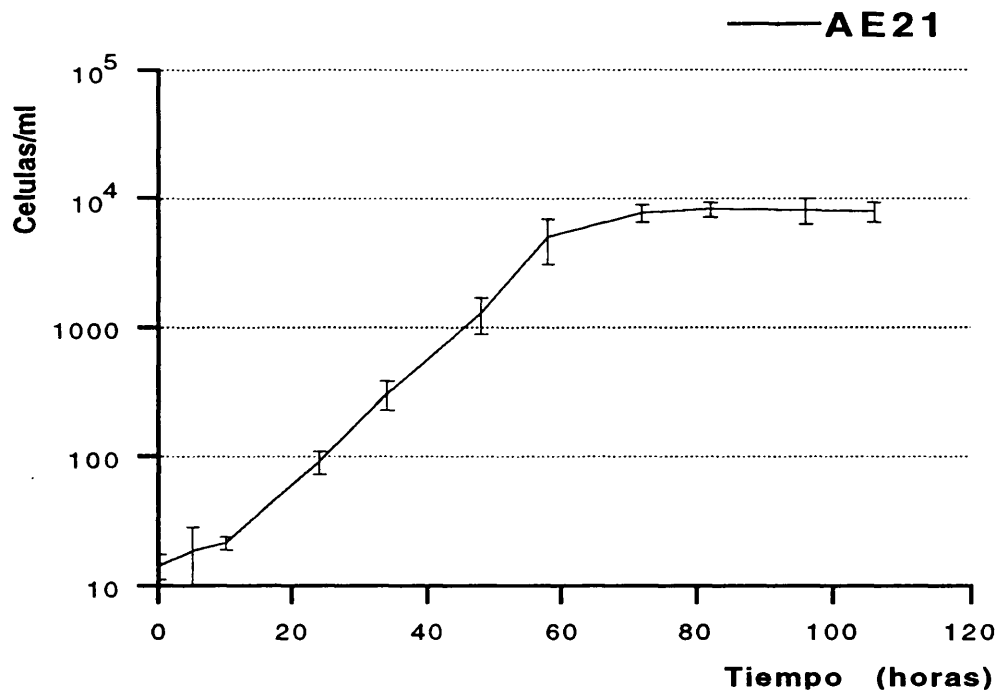
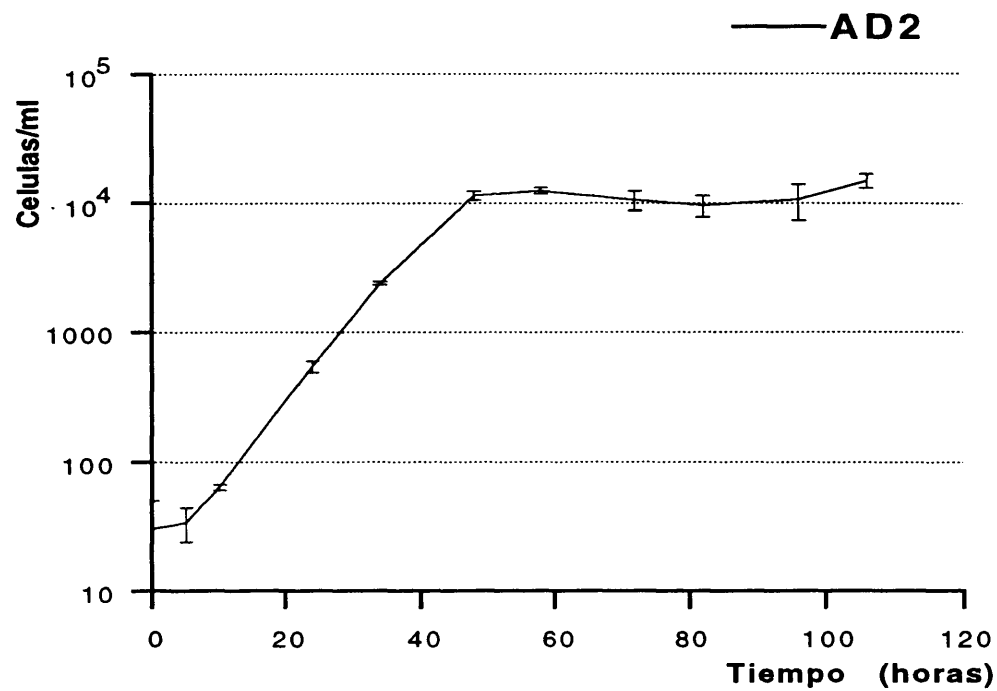


Figura 32.- Curvas de crecimiento de los clones **AD2** y **AE21** en cultivo monoxénico con *Vibrio natriegens* NCIMB#857: Morfotipo 1.

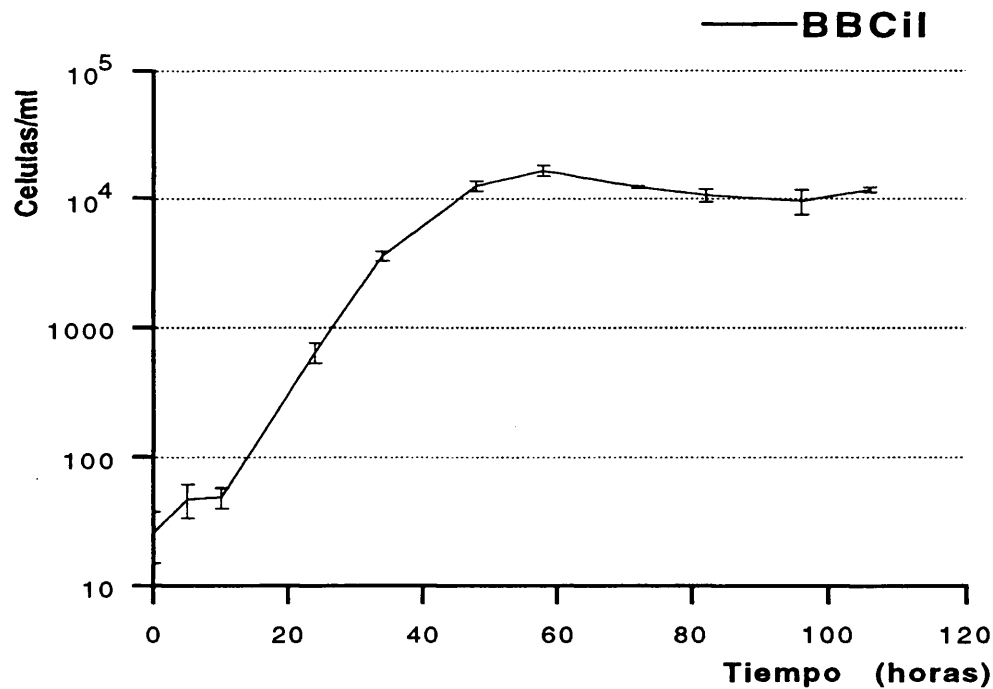
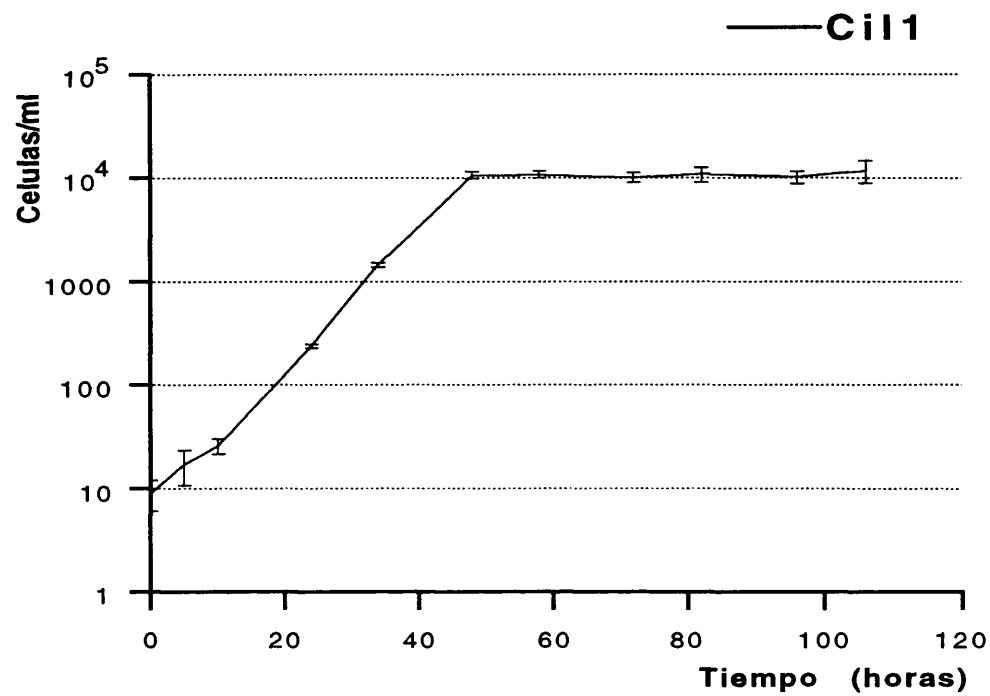


Figura 33.- Curvas de crecimiento de los clones **Cii1** y **BBCil** en cultivo monoxénico con *Vibrio natriegens* NCIMB#857: morfotipo 1.

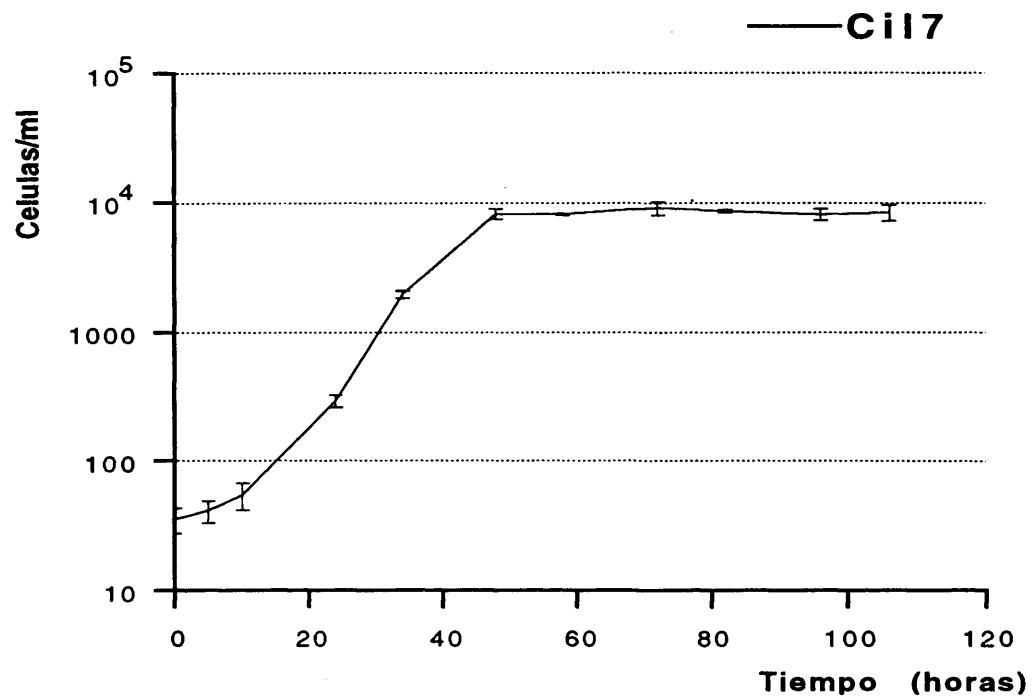


Figura 34.- Curva de crecimiento del clon C117 en cultivo monoxénico con *Vibrio natriegens* NCIMB#857: morfotipo 1.

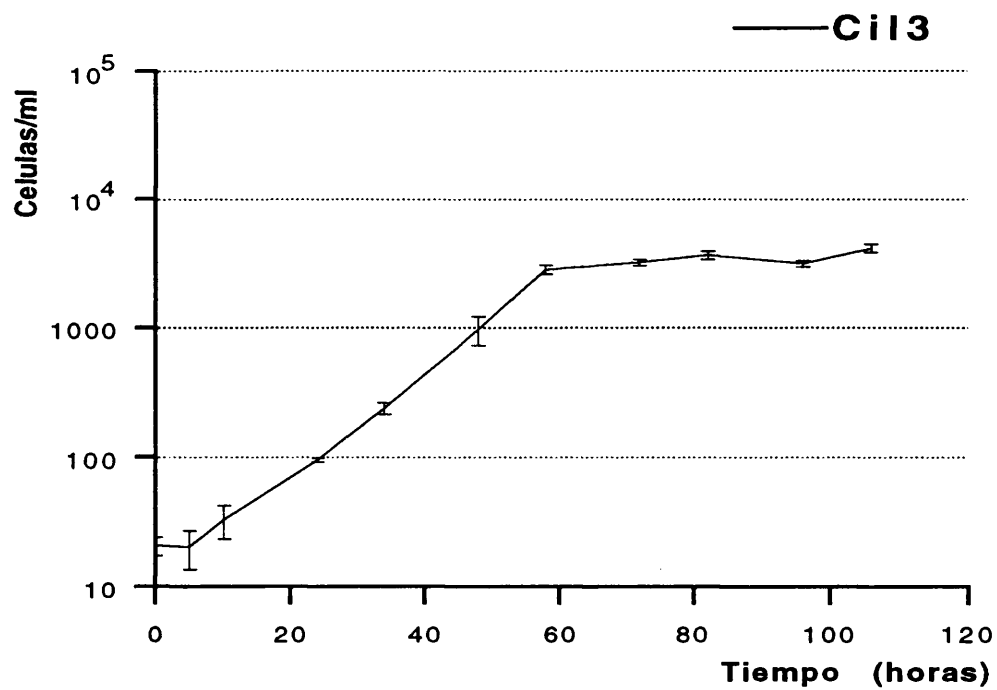
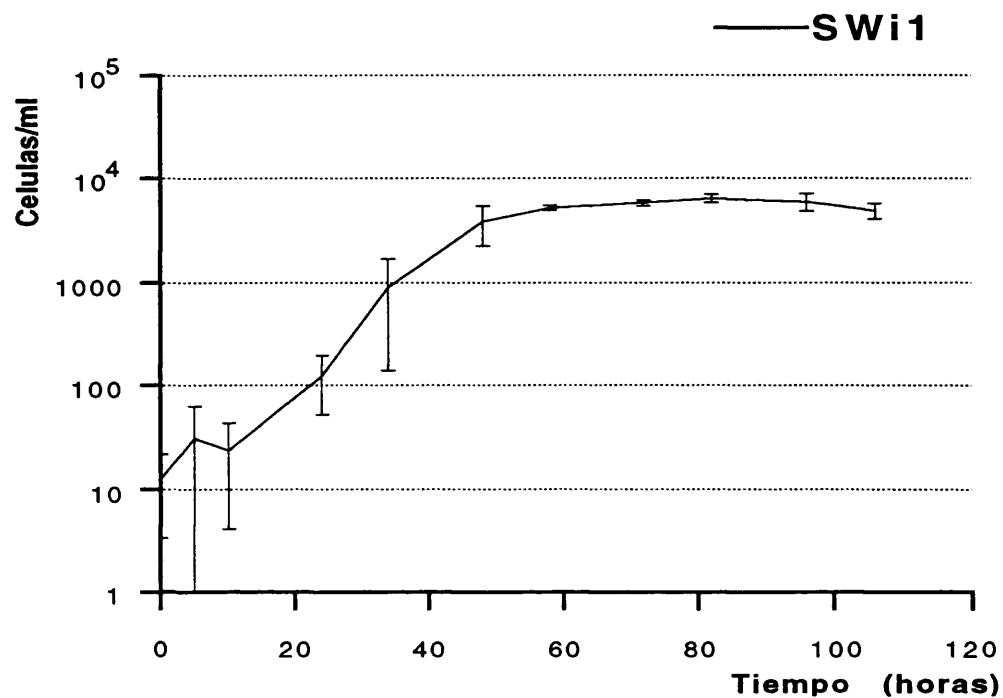


Figura 35.- Curvas de crecimiento de los clones **SWi1** (morfofoto 5) y **Cil3** (morfofoto 4) en cultivo monoxénico con *Vibrio natriegens* NCIMB#857.

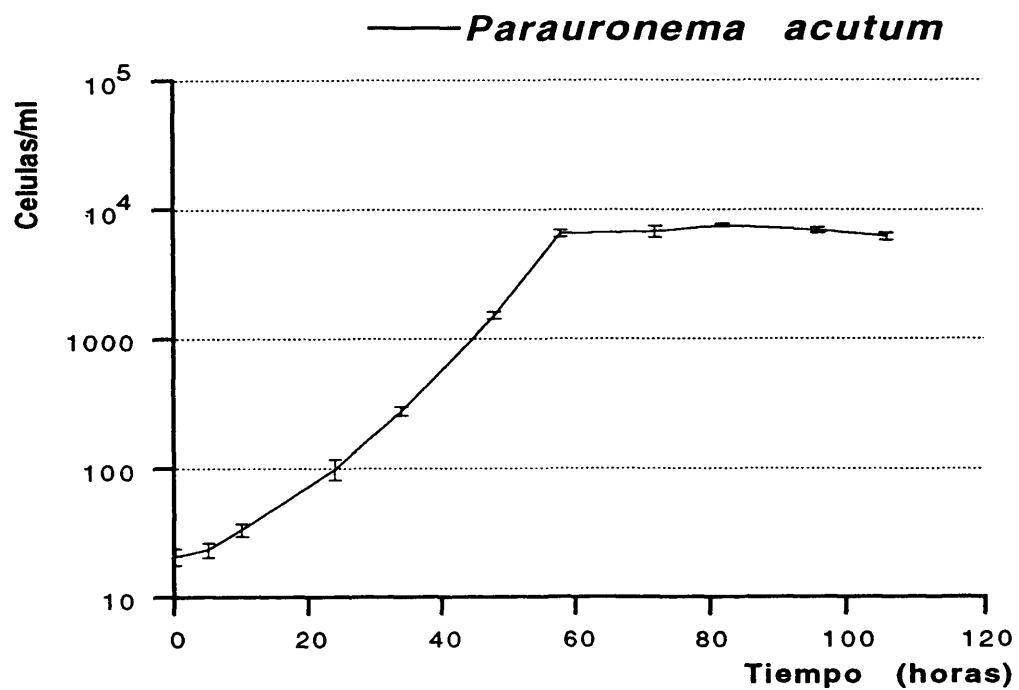


Figura 36.- Curva de crecimiento del clon P.acutum (CCAP) en cultivo monoxénico con *Vibrio natriegens* NCIMB#857: morfotipo 3.

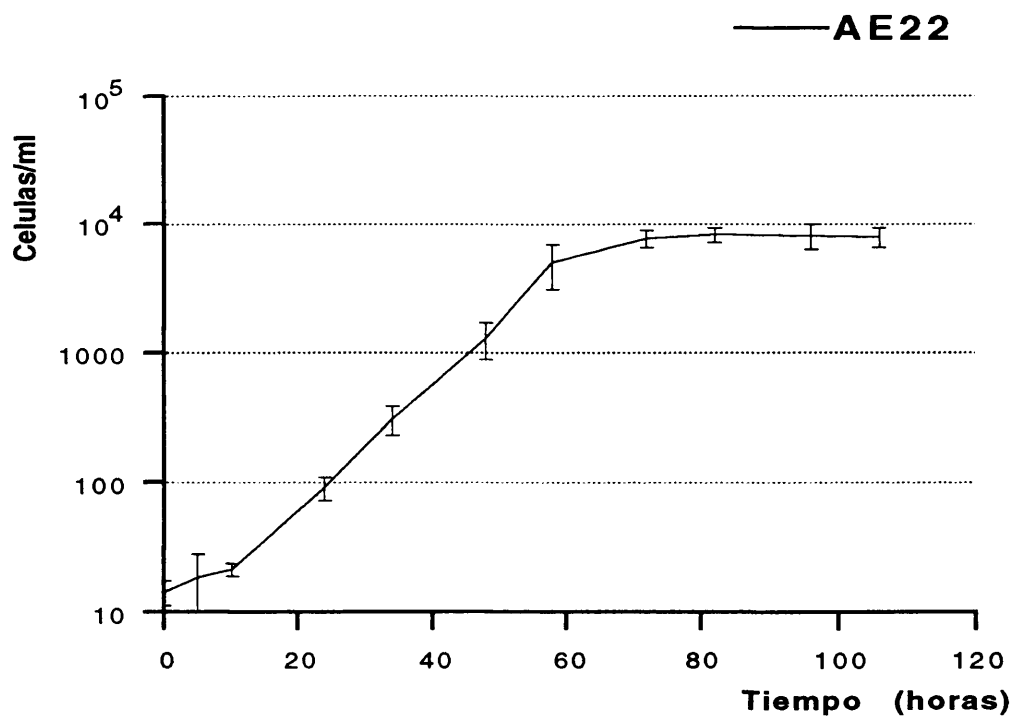
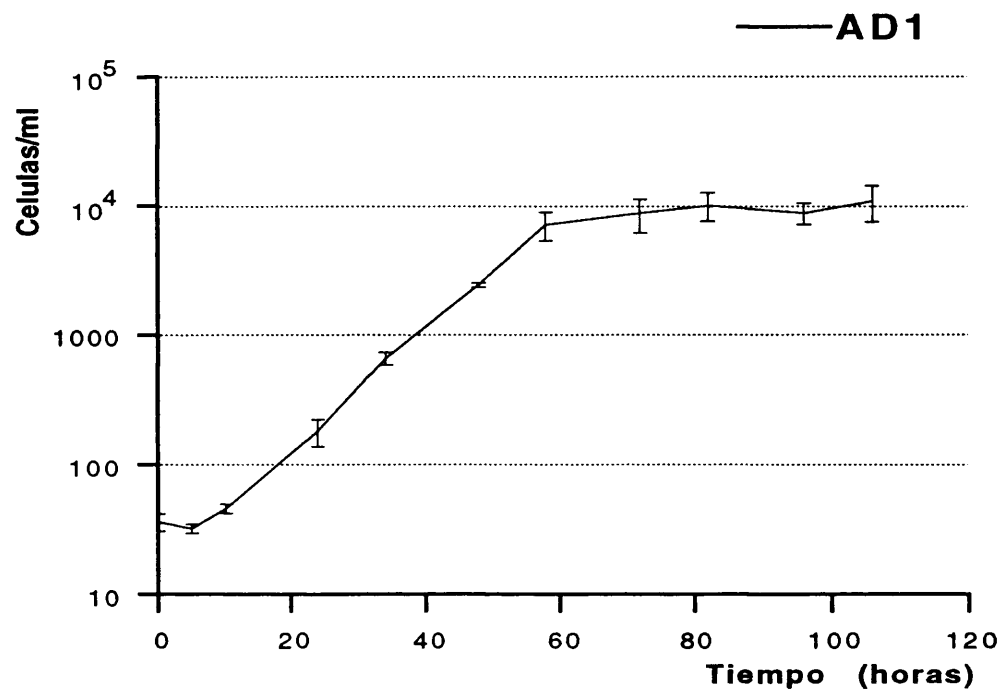


Figura 37.- Curvas de crecimiento de los clones **AD1** y **AE22** en cultivo monoxénico con *Vibrio natriegens* NCIMB#857: morfotipo 2.

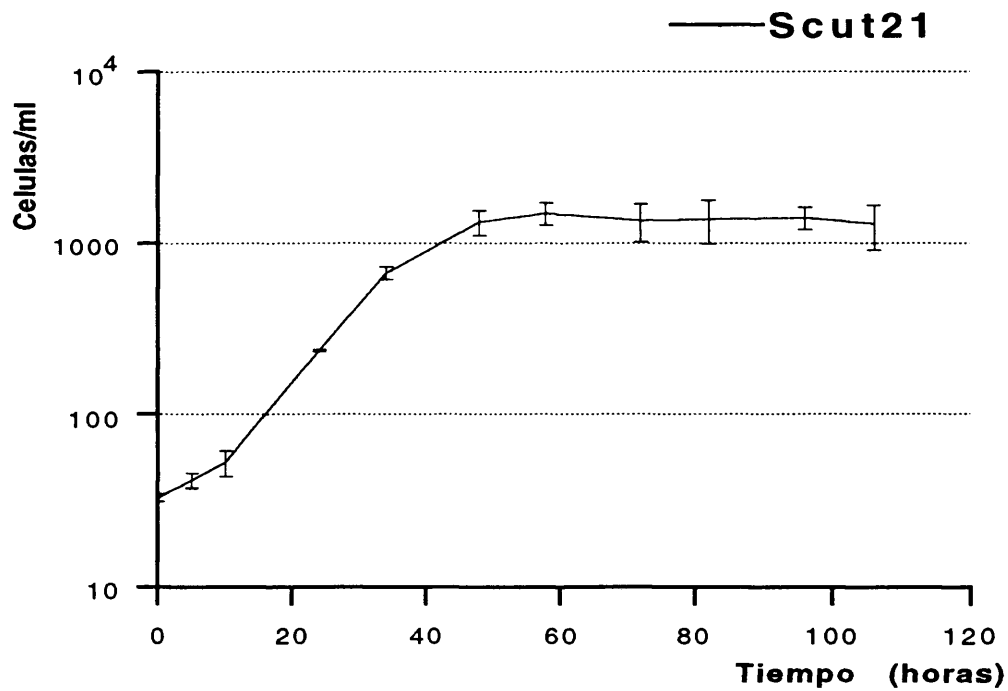
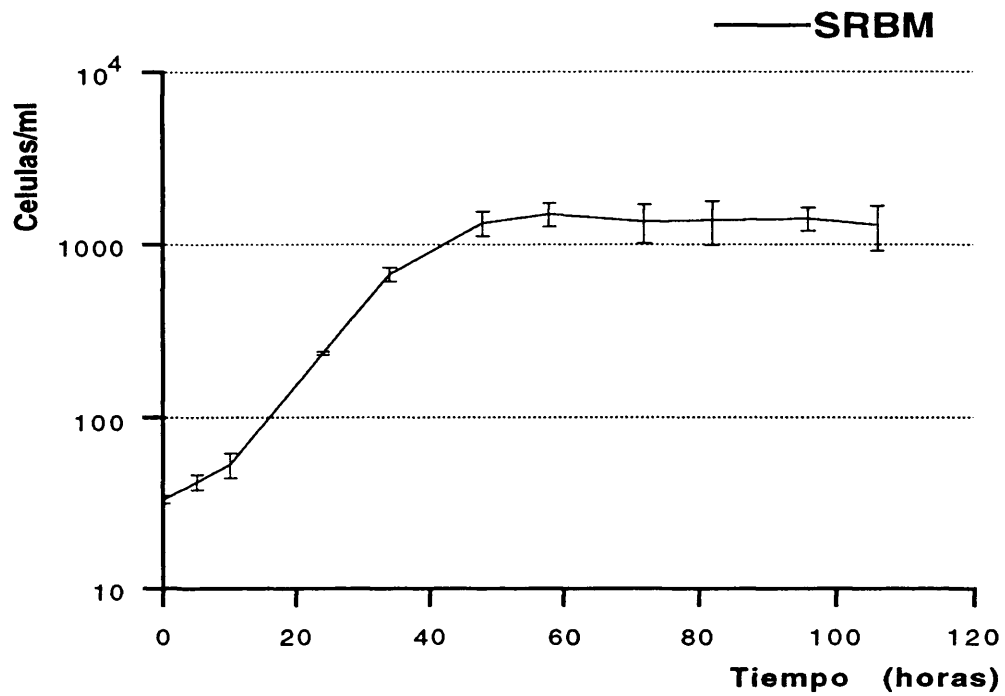


Figura 38.- Curvas de crecimiento de los clones **SRBM** y **SCut 2.1** en cultivo monoxénico con *Vibrio natriegens* NCIMB#857: morfotipo 2.

Las tasas de crecimiento específicas obtenidas sobre las fase logarítmica o exponencial de crecimiento de las curvas, así como tiempos de duplicación y los valores de producción celular netos ($N-N_0$) al final de la fase exponencial para cada clon aparecen en la Tabla 3. La Figura 39 muestra la agrupación de los distintos clones, teniendo en cuenta tanto las tasas de crecimiento, como los valores de producción celular netos al final de la fase exponencial. Los clones marinos **AD1**, **AE22** (morfotipo 2), **P.acutum** (morfotipo 3) y **Cil3** (morfotipo 4) y los de agua dulce **SRBM** y **SCut2.1** (morfotipo 2), se agrupan en un area de bajas tasas de crecimiento y bajas producciones celulares netas con respecto al resto de los clones para las condiciones utilizadas. Los clones pertenecientes al morfotipo 1 muestran siempre mayores tasas de crecimiento específicas que el resto de los morfotipos indicados hasta ahora ($\mu > 0.13$). Llama la atención, sin embargo, las diferencias claras encontradas en dos de los clones incluidos en este morfotipo - clones **X2** y **Ta-** que presentan o muy altos rendimientos numericos (producción celular) al final de la fase exponencial (**X2**) o muy altas tasas de crecimiento específicas (**Ta**) si se comparan con el resto de los clones de este morfotipo. Los clones procedentes de la colección de cultivo (**U. marinum** y **U. schewiakoffi**) se separaron del grupo principal en el que quedaron el resto de los clones del morfotipo 1, principalmente en lo que se refiere a la producción celular neta al final de la fase exponencial.

Las tasas de crecimiento específicas para este morfotipo 1 presentan correlación negativa con la producción celular neta al final de la fase exponencial de crecimiento. Por lo tanto, para la misma concentración bacteriana a mayor tasa de crecimiento, menor será el rendimiento celular obtenido al final de la fase exponencial.

Clon		μ (horas ⁻¹)	T _D (horas)	N-N ₀ (cels/ml)
U.marinum	V.n	0.178 ± 0.005	3.885 ± 0.103	4769 ± 309
	E.a	0.135 ± 0.005	5.126 ± 0.172	8019 ± 358
U.schewiakoffi		0.161 ± 0.022	4.305 ± 0.545	2607 ± 222
P.acutum		0.109 ± 0.001	6.333 ± 0.056	6466 ± 331
X2		0.150 ± 0.008	2.592 ± 0.056	21000 ± 403
Ta		0.250 ± 0.031	2.816 ± 0.326	2530 ± 363
AD1		0.105 ± 0.005	6.581 ± 0.326	7121 ± 1418
AD2		0.136 ± 0.005	5.110 ± 0.189	11403 ± 749
AE21		0.157 ± 0.009	4.426 ± 0.249	11237 ± 561
AE22		0.114 ± 0.008	6.087 ± 0.422	5023 ± 1580
SWi1		0.134 ± 0.009	5.175 ± 0.349	3829 ± 1299
Cil1		0.158 ± 0.003	4.377 ± 0.075	10657 ± 674
BBCil		0.146 ± 0.004	4.748 ± 0.134	12518 ± 880
Cil7		0.132 ± 0.005	5.255 ± 0.209	8162 ± 613
Cil3		0.094 ± 0.007	7.451 ± 0.476	2816 ± 200
SRBM	V.n	0.128 ± 0.010	5.457 ± 0.450	816 ± 109
	E.a	0.088 ± 0.002	7.871 ± 0.197	1743 ± 79
SC21	V.n	-----	-----	-----
	E.a	0.107 ± 0.004	6.513 ± 0.210	619 ± 53

Tabla 3.- Tasas de crecimiento características de los clones estudiados y producción celular.

μ .- Tasa media de crecimiento específico en horas⁻¹

T_D.- Tiempo de duplicación en horas

N-N₀.- Celulas.ml⁻¹

Los datos expuestos en la forma (X ± SD)

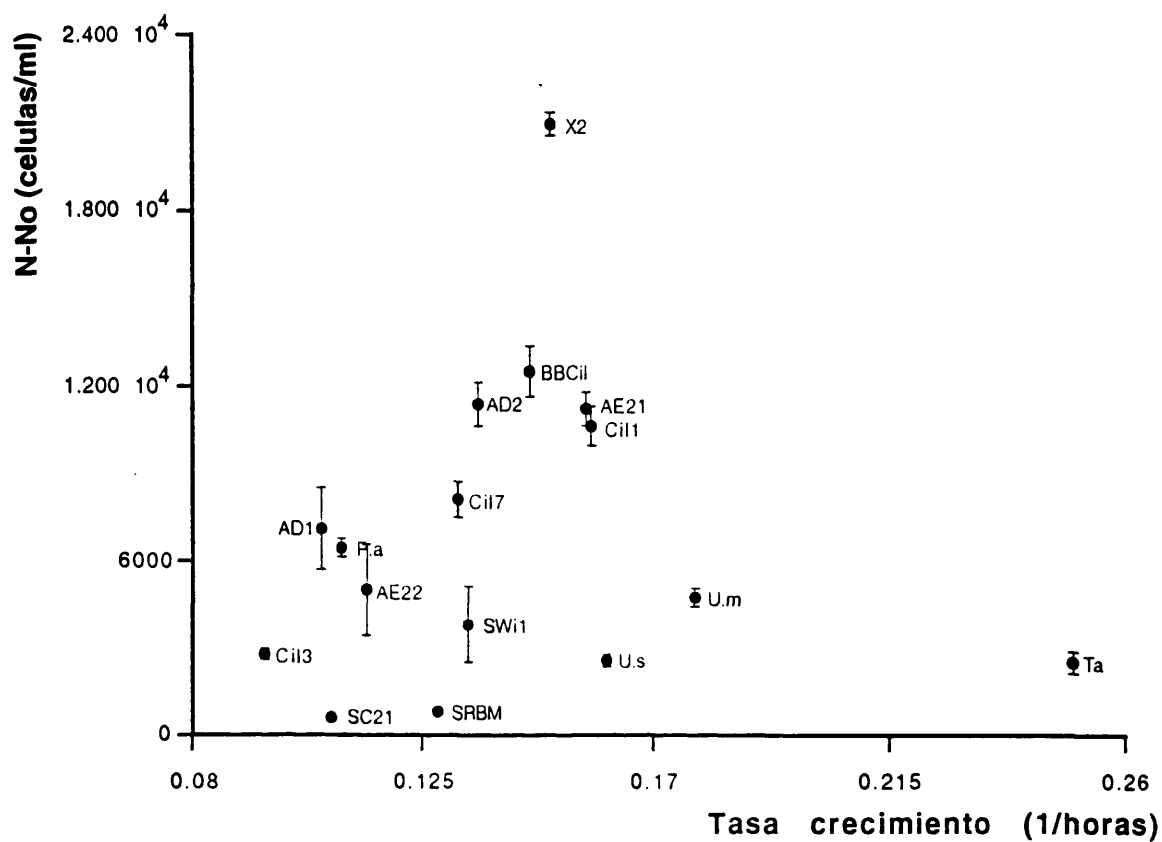


Figura 39.- Tasas de crecimiento ($\mu=1/\text{horas}$) frente a producción celular neta al final de la fase exponencial ($N-N_0=\text{Celulas/ml}$) en todos los clones estudiados.

Se observó, asimismo, que la tendencia general en todos los clones estudiados, en cuanto a la correlación entre la tasa de crecimiento y los volúmenes celulares (fase estacionaria) es negativa, esto es, a mayor volumen celular menor tasa de crecimiento. Sin embargo, esta tendencia se invierte si esta relación es estudiada únicamente dentro de cada morfotipo mayoritario (más de un clon), es decir en los morfotipos 1 y 2. En éstos, la tendencia es que los clones de mayor volumen celular presentan una mayor tasa de crecimiento. Así en el caso del morfotipo 1, los clones U. marinum y U. schewiakoffi que fueron los que presentaron mayores volúmenes celulares, fueron los que presentaron mayores tasas de crecimiento.

La relación observada entre la producción celular al final de la fase exponencial de crecimiento, y el volumen celular en los clones, fue de nuevo de correlación negativa. Esto es, los clones con mayor producción celular neta al final de la fase exponencial, son los que presentan menores volúmenes celulares, siendo por tanto los clones más pequeños. Los clones U. marinum y U. schewiakoffi, que como se observó presentaron los mayores volúmenes celulares y las mayores tasas de crecimiento, presentan sin embargo las menores producciones celulares para una misma unidad de tiempo.

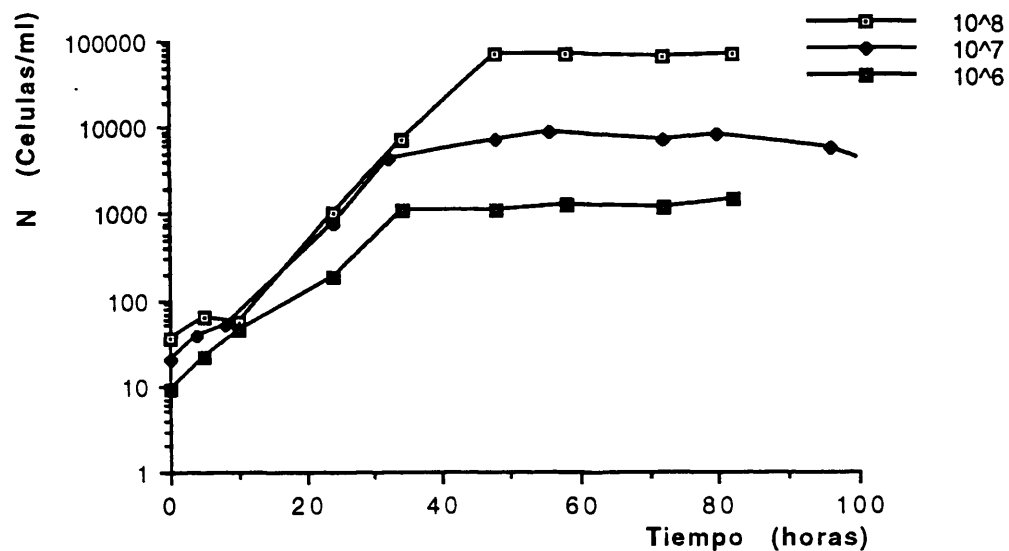
4.2.2. Estudio trofodinámico comparativo de dos clones de Uronema

Las cinéticas de crecimiento de los clones U. marinum y SRBM fueron estudiadas comparativamente con tres tipos distintos de bacterias. Este estudio se llevó a cabo no sólo para comprobar si los efectos observados para un único tipo de bacteria obtenidos en principio se mantenían en el caso de la variación de la concentración del alimento y del tipo de bacteria, sino también para poder obtener parámetros objetivos de la capacidad de predación de ambos clones sobre estas, ya que ambos procedían de muy distintos medios (marino y dulceacuícola), estos parámetros podrían dar una idea de la función de los dos morfotipos mayoritarios encontrados entre los clones estudiados en los distintos medios en los que se encuentran.

Los experimentos rindieron curvas de crecimiento para cada una de las bacterias a tres concentraciones distintas, las cuales aparecen en las Figuras 40, 41 y 42. Los parámetros de crecimiento obtenidos a partir de dichas curvas aparecen en la Tabla 4 para el caso de U. marinum y 5 para el caso de SRBM.

Los datos expresados en dichas tablas fueron utilizados para la aproximación de μ_{\max} (tasa de crecimiento máxima) y K_M (constante de saturación o de Michaelis-Menten) sobre la regresión lineal de la representación doble recíproca de las tasas de crecimiento específicas (μ) frente a la concentraciones bacterianas en el medio utilizado. Los resultados de éstas aparecen en la Tabla 6.

Uronema marinum* / *V. natriegens



SRBM* / *V. natriegens

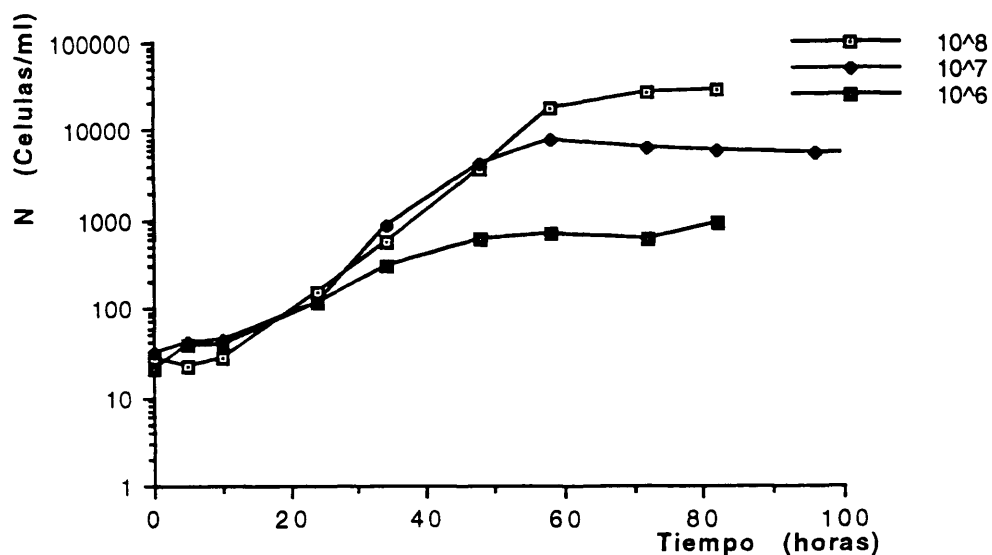
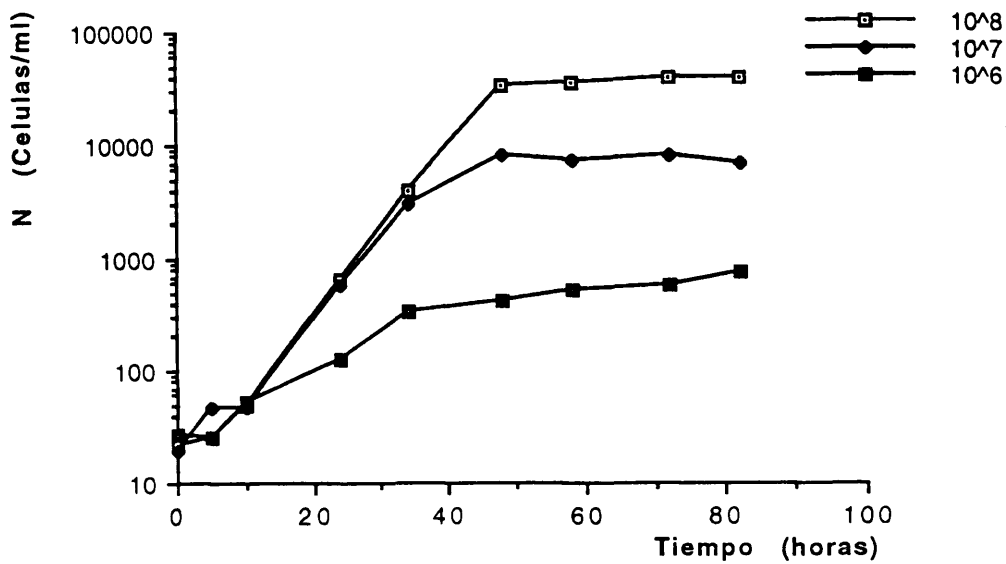


Figura 40.- Curvas de crecimiento de los clones *U. marinum* y *SRBM* en cultivo monoxénico con tres concentraciones distintas (10^6 , 10^7 y 10^8 bacterias/ml) de la estirpe *Vibrio natriegens* NCIMB#857.

Uronema marinum* / *E. aerogenes



SRBM* / *E. aerogenes

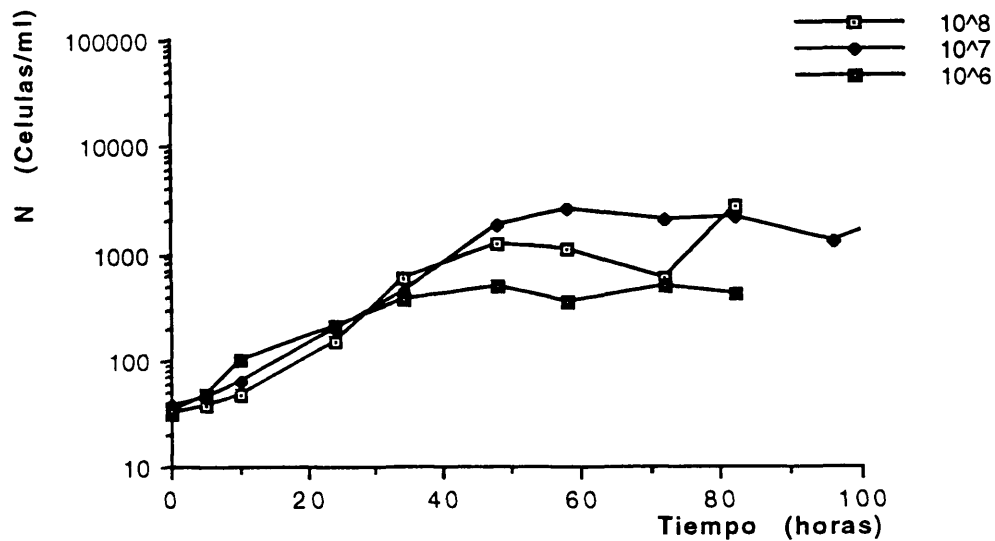
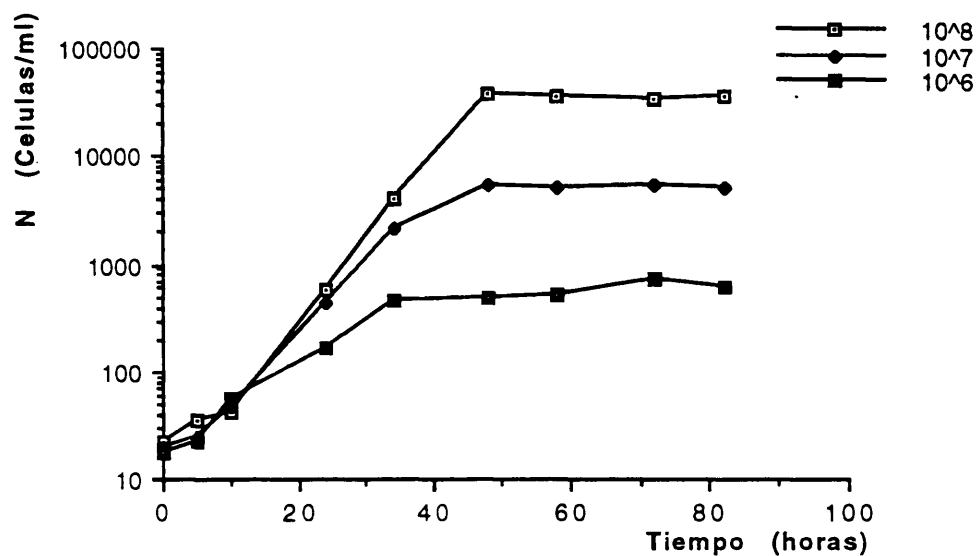


Figura 41.- Curvas de crecimiento de los clones *U. marinum* y *SRBM* en cultivo monoxénico con tres concentraciones distintas (10^6 , 10^7 y 10^8 bacterias/ml) de la estirpe *E. aerogenes* (#1808 - Surrey University).

***Uronema marinum* / RBM-1**



***SRBM* / RBM-1**

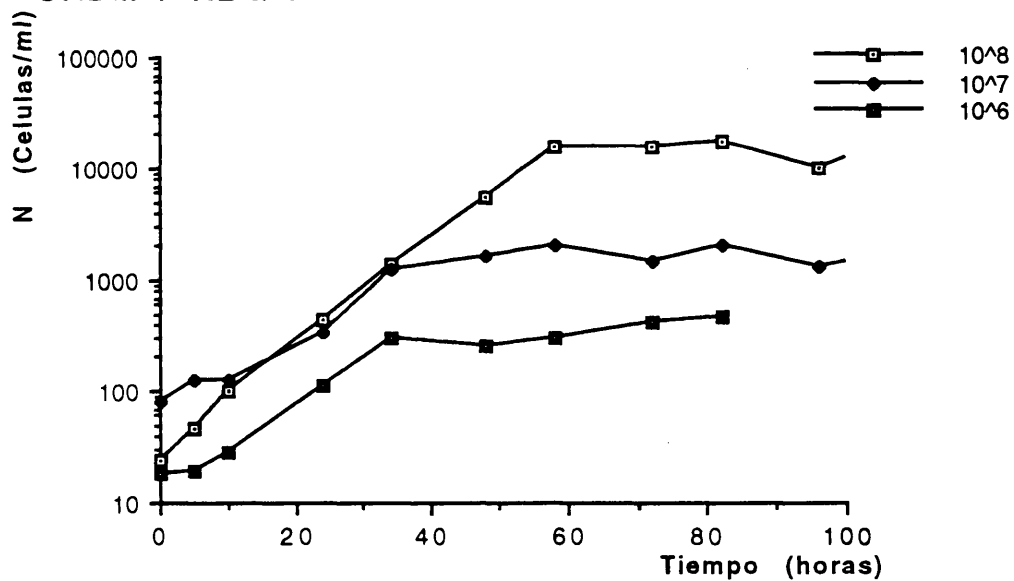


Figura 42.- Curvas de crecimiento de los clones *U. marinum* y *SRBM* en cultivo monoxénico con tres concentraciones distintas (10^6 , 10^7 y 10^8 bacterias/ml) de la estirpe RBM-1.

Uronema marinum

Bacteria	Bacteria/ml	μ (horas ⁻¹)	T _D (horas)
V.n	1.01.10 ⁸	0.187 ± 0.004	3.703 ± 0.070
V.n	1.00.10 ⁷	0.178 ± 0.005	3.885 ± 0.103
V.n	1.05.10 ⁶	0.136 ± 0.008	5.101 ± 0.274
E.a	1.02.10 ⁸	0.172 ± 0.004	4.029 ± 0.081
E.a	1.02.10 ⁷	0.135 ± 0.005	5.126 ± 0.172
E.a	1.02.10 ⁶	0.077 ± 0.009	9.054 ± 1.131
RBM-1	1.03.10 ⁸	0.180 ± 0.004	3.858 ± 0.080
RBM-1	1.04.10 ⁷	0.160 ± 0.002	4.341 ± 0.059
RBM-1	1.03.10 ⁶	0.088 ± 0.012	7.836 ± 1.156

Tabla 4.- Tasas de crecimiento (μ) y tiempos de duplicación(T_D) de Uronema marinum en Vibrio natriegens, Enterobacter aerogenes y RBM-1.

μ .- Tasa de crecimiento específica en horas⁻¹

T_D.- Tiempos de duplicación en horas

Datos expresados en la forma (X ± SD)

SRBM

Bacteria	Bacteria/ml	μ (horas ⁻¹)	T _D (horas)
V.n	1.01.10 ⁸	0.135 ± 0.002	5.141 ± 0.086
V.n	1.04.10 ⁷	0.128 ± 0.010	5.457 ± 0.450
V.n	1.12.10 ⁶	0.084 ± 0.002	8.268 ± 0.237
E.a	1.02.10 ⁸	0.105 ± 0.002	6.588 ± 0.133
E.a	1.05.10 ⁷	0.088 ± 0.002	7.871 ± 0.197
E.a	1.14.10 ⁶	0.070 ± 0.003	9.766 ± 0.440
RBM-1	9.15.10 ⁷	0.106 ± 0.003	6.678 ± 0.224
RBM-1	1.14.10 ⁷	0.095 ± 0.008	7.305 ± 0.675
RBM-1	1.04.10 ⁶	0.056 ± 0.001	12.315 ± 0.127

Tabla 5.- Tasas de crecimiento (μ) y tiempos de duplicación (T_D) de SRBM en Vibrio natriegens, Enterobacter aerogenes y RBM-1.

μ .- Tasas de crecimiento específico en horas⁻¹

T_D.- Tiempo de duplicación en horas

Datos expresados en la forma (X ± SD)

Ciliate	Bacteria	K_s	μ_{max}
<u>U.marinum</u>	V.n	3.89×10^5	0.1863
	E.a	1.12×10^6	0.1609
	RBM-1	1.07×10^6	0.1791
SRBM	V.n	6.78×10^5	0.1346
	E.a	4.47×10^5	0.0980
	RBM-1	9.08×10^5	0.1048

Tabla 6.- Estimaciones de las constante de saturación (K_s) y tasas maximas de crecimiento (μ_{max}) de los clones U. marinum y SRBM en las estirpes Vibrio natriegens, Enterobacter aerogenes y RBM-1.

K_s .- Constante de saturación en bacterias/ml
 μ_{max} .- Tasa máxima de crecimiento en horas⁻¹

La tasa máxima de crecimiento (μ_{\max}) en ambos ciliados es aproximada asintóticamente a concentraciones mayores de 10^7 bacterias/ml (Figura 43).

El clon U.marinum para todas las bacterias estudiadas y todas las concentraciones de éstas, presenta siempre mayores tasas específicas de crecimiento (Figura 43). Se observó que en los dos casos, las mayores tasas específicas de crecimiento se obtuvieron con la estirpe bacteriana *Vibrio natriegens* (NCIMB#857), mientras que las menores tasas específicas de crecimiento se obtuvieron, asimismo, en ambos clones con *Enterobacter aerogenes*, aunque el clon SRBM parece alcanzar similares tasas máximas de crecimiento sobre esta estirpe que sobre la estirpe RBM-1.

Los valores estimados de las constantes de saturación fueron menores para *E.aerogenes* y RBM-1 en el caso del clon SRBM, lo que indicaría la superioridad competitiva con este tipo de estirpes de este clon a bajas concentraciones bacterianas (Tabla 6). Sin embargo, como se puede observar el clon U.marinum, parece ser competitivamente superior en el caso de la estirpes *V.natriegens*, estirpe que como dicho clon es marina (Tabla 5).

Las diferencias entre la utilización de ambas estirpes se observaron, asimismo, en producción celular neta obtenida al final de la fase exponencial, que se representó frente a las distintas concentraciones de las bacterias utilizadas en la Figura 44. El clon U.marinum de nuevo presenta producciones celulares netas al final de la fase exponencial mayores que los obtenidos en el caso del clon SRBM. El crecimiento o producción celular neta de U. marinum es mayor sobre la estirpe *V. natriegens*, reduciéndose prácticamente al mismo orden en los casos de las estirpes *E. aerogenes* y RBM-1, ambas dulceacuícolas. El clon SRBM presenta una producción celular neta del mismo orden para las bacterias *V. natriegens* y RBM-1, aunque

estos son de tres a cuatro veces menores que los obtenidos en el caso de U.marinum. La menor producción celular del clon SRBM, se produjo de nuevo sobre la estirpe *E. aerogenes*, aunque a bajas concentraciones presentó prácticamente la misma producción celular neta que el clon U.marinum. A las mayores concentraciones, la producción celular en este clon se mantuvo casi al mismo nivel que a bajas concentraciones de presa.

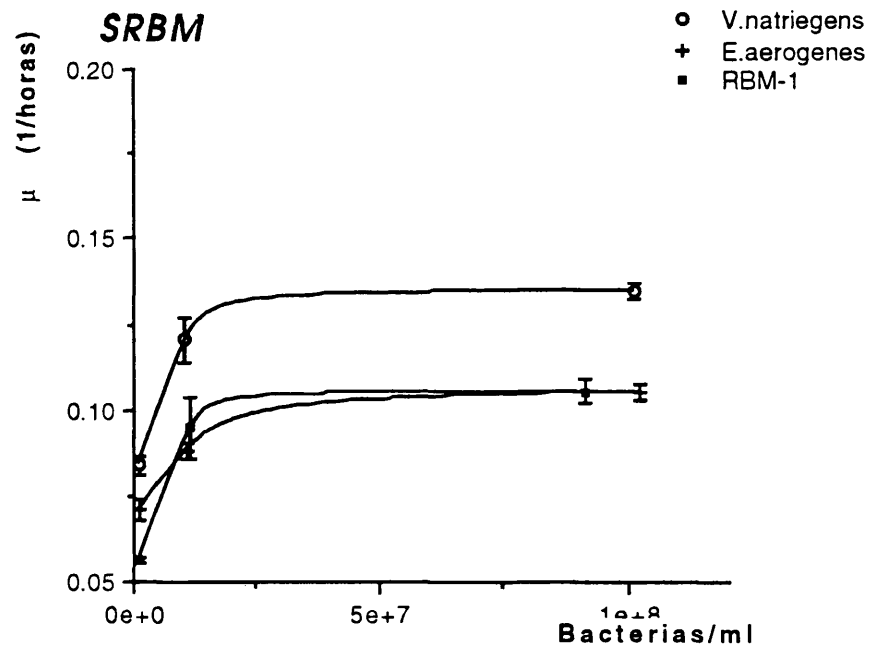
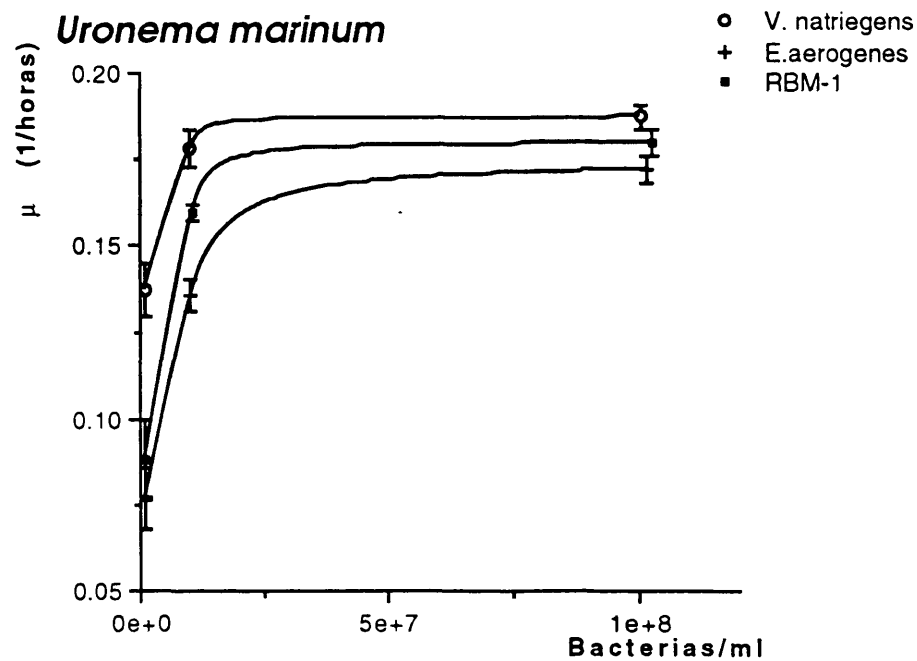


Figura 43.- Representación semilogarítmica de las tasas de crecimiento específicas (μ =horas⁻¹) de *U. marinum* y SRBM para cada concentración de las tres estirpes bacterianas utilizadas.

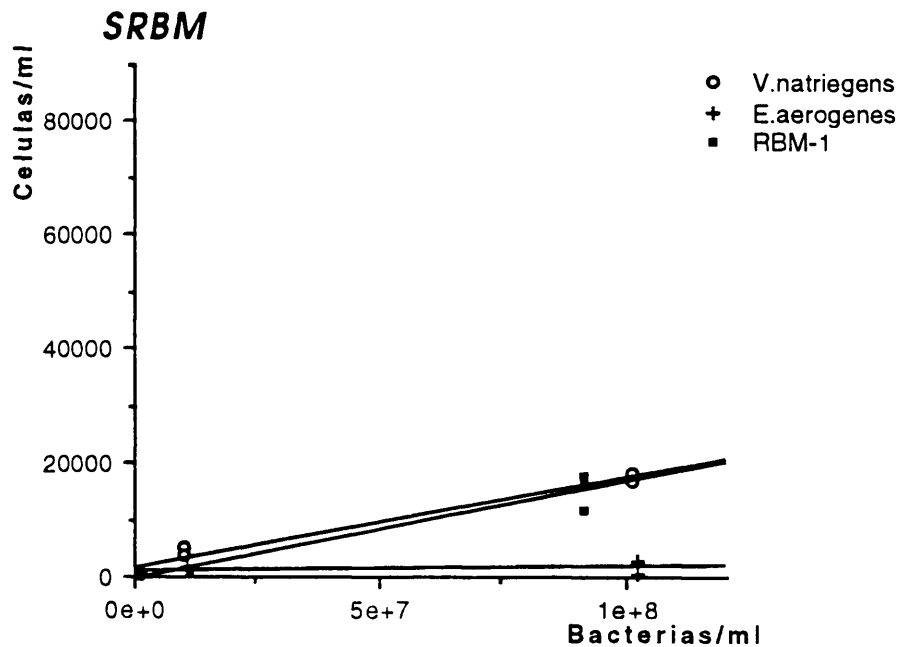
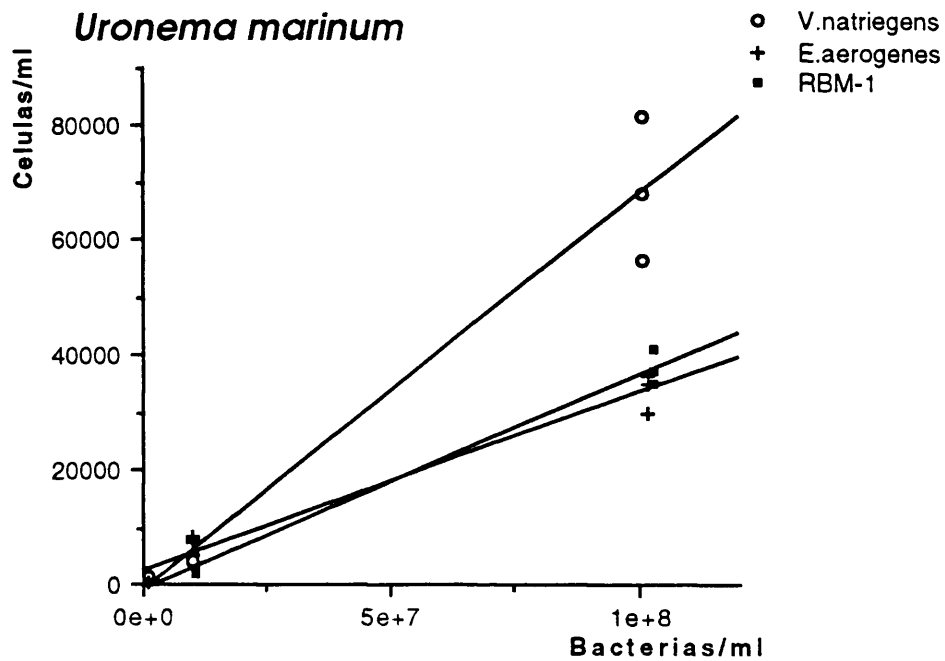


Figura 44.- Representación semilogarítmica de las producciones celulares al final de la fase exponencial ($N-N_0$ = Celulas/ml) en U.marinum y SRBM para cada concentración de las tres estirpes bacterianas utilizadas.

4.3.1. Efectos de las impregnaciones sobre los distintos clones.

Los resultados obtenidos con las diferentes impregnaciones llevadas a cabo con ciliados en las dos fases de crecimiento pueden ser enfocados desde dos puntos de vista: por un lado la observación de la capacidad de cada tipo de tinción para poner de manifiesto estructuras y por otro el efecto biométrico producido sobre éstas o en la célula en sí para cada uno de los clones.

El primer aspecto se refiere a la capacidad de cada una de las impregnaciones para teñir ciertas estructuras de la célula y la calidad de dicha tinción, en cuanto que permite la observación de estas estructuras inequívocamente para su identificación.

El segundo aspecto está referido a los efectos que el tratamiento de las distintas impregnaciones producen sobre las dimensiones y por tanto volumen celulares, lo cual podría afectar a su vez a las medidas tomadas sobre las estructuras observables en las diferentes impregnaciones y sus situaciones respectivas en la célula. Cuando hablamos de estructuras nos referimos principalmente a las estructuras normalmente consideradas en el estudio taxonómico del género al que nos referimos, esto es, estructuras bucales tales como las policinetias y haplocinetia.

Carbonato de plata amoniacal (Fernández-Galiano, D., 1976)

La impregnación con carbonato de plata amoniacal permitió la observación, en el caso de la infraciliación somática, de las cinetias y en éstas los cinetosomas y fibras cinetodésmicas acompañantes, estructuras éstas últimas que no se pueden observar con la aplicación de los otros métodos (Téllez, C. y col., 1982). Esta impregnación permite visualizar también los sacos parasómicos asociados con los cinetosomas. La presencia de sacos parasómicos entre cinetosomas de algunas de las estructuras de la infraciliación bucal (policinetias y haplocinetia) indujo a la confusión y por tanto asumpción errónea de la presencia de cinetosomas que en realidad no lo son, este extremo fue resuelto en algunos de los casos estudiados por medio de microscopía electrónica de transmisión.

El segmento C de la haplocinetia o vestigio del escutico fue bastante difícil de identificar sobre todo en aquéllas células que no se encontraban en proceso de división, lo cual originó dudas en cuanto a la composición real de dicha estructura. Este caso se resolvió con la ayuda de la técnica de Chatton-Lwoff.

La observación de estructuras como el citopigio, el poro de la vacuola contráctil y el complejo basal del cilio caudal e incluso a veces el círculo argentófilo que le rodea, fue posible por medio de esta impregnación. La calidad de ésta permitió la máxima aproximación a la realidad en la composición de las estructuras bucales, calidad que no se ha encontrado para los clones estudiados con ninguna de las otras dos impregnaciones estudiadas. La característica más sobresaliente de esta calidad, con respecto a las otras impregnaciones, es debida a que los

mucocistos y los cilios no son impregnados generalmente, lo que produce una imagen muy clara, únicamente de la infraciliación. La utilización conjunta de otras impregnaciones o de microscopía electrónica fue necesaria, como ya se ha mencionado, para resolver ciertos casos dudosos, por ejemplo el caso de la polycinetia 1 (M1) en el clon Cil3 (se discutirá más adelante).

Nitrato de plata o técnica de Chatton-Lwoff

La impregnación con nitrato de plata o técnica de Chatton-Lwoff, permitió la observación de la infraciliación somática: observación de los cinetosomas, pares y sencillos en los que se acumulan gránulos de plata alrededor de sus bases, tanto en la región epiplásmica de las depresiones ciliares como dentro del cuerpo basal [Foissner, 1981; Lynn, 1977 #351].

Las regiones distales de numerosos mucocistos aparecen, asimismo, impregnadas entre cinetosomas en las cinetias y en diferentes zonas del sistema argentófilo, lo que hace en muchos casos difícil la identificación de cinetosomas en las cinetias. Estos mucocistos en muchos casos aparecen en determinadas posiciones constantes en todos los clones estudiados, por ejemplo, en el área opuesta a la región B de la haplocinetia, aparece una línea argentófila que rodea el citostoma, en esta línea aparecen siempre dos manchas argentófilas, que se han interpretado como mucocistos (Dippell, R.V., 1962; Lynn, D.H., 1977).

Los sacos parasómicos acompañantes en las cinetias somáticas no parecen ponerse de manifiesto con esta impregnación, sin embargo sí se puede producir deposición de sales de plata en poros de la superficie celular aunque la forma de estos suele ser distinguible de la de los cinetosomas.

La presencia de sistema de líneas argentófilo se pudo observar en las cinetias, entre ellas y en conexión con las estructuras bucales, aunque de manera muy ligera. Estas líneas han sido identificados por algunos autores como los límites de las vesículas alveolares o "cortical ridges" (Dippell, 1962; Lynn, 1977; Hiller, S.A. y Bardele, C.F., 1988), límite que hemos podido comprobar por medio de microscopía electrónica en alguno de los clones estudiados, concretamente en el clon Cil3 (Láminas 26 f y 28 e).

La infraciliación bucal sólo se pudo observar inequívocamente en el caso de la composición de la policineta 1 o M1. La composición de las policinetas 2 y 3 (M2 y M3) o la haplocinetia fue casi imposible de identificar cinetosomas individuales y sólo se pudo comprobar su forma y disposición. La composición, por tanto, de la policineta 1 se pudo confirmar claramente gracias a la utilización de esta tinción, eliminando como se verá en algunos casos la confusión por la presencia en dicha estructura de sacos parasómicos. La composición del escutico se confirmó, como ya se ha indicado anteriormente, gracias también a esta tinción.

Protargol

La impregnación de estos clones con protargol no produjo buenos resultados, excepto en el caso de los clones de Parauronema acutum (Lámina 8 h) y Cil3 (Lámina 27 a, b, c, d), donde algunas de las estructuras somáticas y bucales se pudieron identificar. Las características típicas de esta técnica, como son la capacidad para impregnar los cinetosomas y los cilios en sí (Zagon, I.S., 1970), así como extrusomas, muy abundantes en la superficie celular de estos ciliados que son eyectados durante el proceso de tinción (Ahola, J., 1993), imposibilitaron el estudio de la infraciliación prácticamente en todos los clones.

El macro y micronúcleo se observaron impregnados con esta técnica, pero el material nuclear de ambos parece quedar contraído ligeramente, mientras que la membrana nuclear parecía mantenerse en la posición original (Láminas 6 h, 15 j, 16 h, 17 j, 20 g, 21 i, 24 g, 27 a,g).

El estudio biométrico en el caso de esta impregnación se llevó a cabo considerando únicamente el tamaño celular (longitud y anchura) y el tamaño de macronúcleo y micronúcleo, cuando fue posible su observación. Los resultados medios obtenidos para cada uno de los clones de las medidas aparecen en las Tablas 11.1, 11.2, 12.1 y 12.2. La contracción del material nuclear como puede observarse en dichas tablas afecta mayormente a la anchura del macronúcleo, forzando una forma alargada más que redondeada u ovalada, como se observa en las impregnaciones con carbonato de plata amoniacal.

4.3.1.2. Efectos biométricos de las impregnaciones

El segundo aspecto del estudio fue la observación de los efectos de las distintas impregnaciones. Los datos originales de medidas obtenidas para cada uno de los clones en vivo y tras el tratamiento con los distintos tipos de impregnación utilizados, aparecen en el anexo 2. Las matrices originales de datos fueron construídas con éstos. Los datos medios se pueden observar para las medidas en vivo en la Tabla 7, para las medidas en carbonato de plata amoniacal en las Tablas 8.1, 8.2 y 8.3 en fase exponencial y 9.1, 9.2 y 9.3 en fase estacionaria; para las medidas en nitrato de plata las Tablas 10.1, 10.2 en fase exponencial y 11.1 y 11.2 en fase estacionaria y finalmente para protargol las Tablas 12.1 y 12.2 para la fase exponencial y 13.1 y 13.2 para la fase estacionaria de crecimiento.

El estudio comparativo entre todos los clones sólo se

pudo realizar en el caso de aquéllas variables comunes a todos ellos, que fueron las variables de longitud y anchura celulares. Los resultados expuestos en la Figura 45 representan las dos fases de crecimiento estudiadas y los efectos de las tres tinciones en comparación con las células en vivo sobre dichas variables. Dicha figura representa los datos medios de las variables comunes (longitud y anchura) correspondientes a cada clon con cada una de las tres impregnaciones y a las células medidas directamente en vivo.

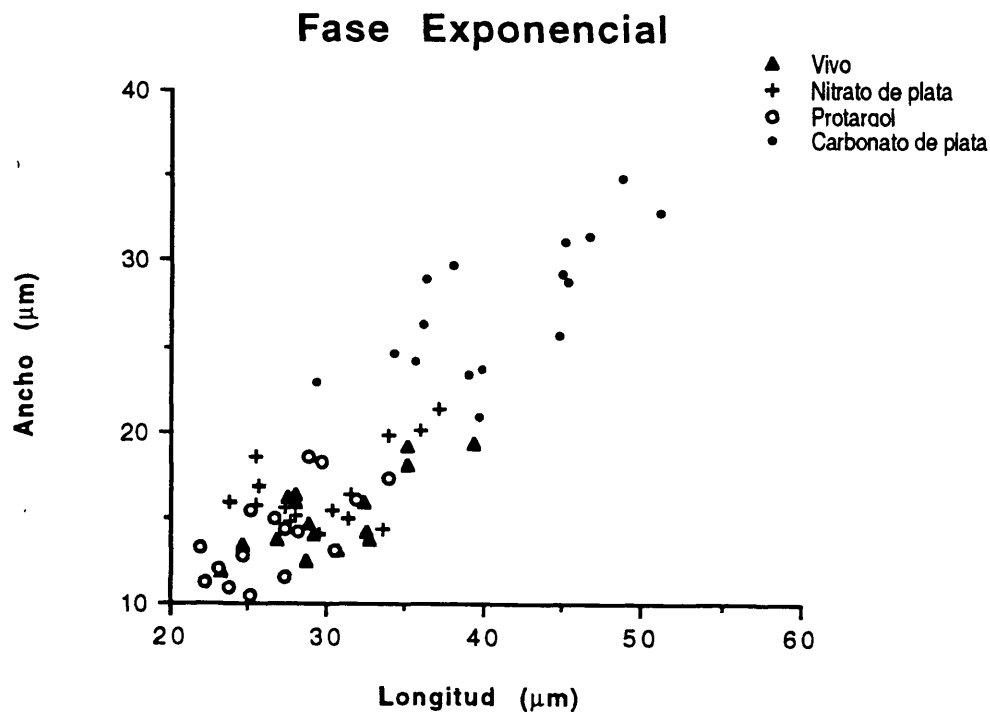
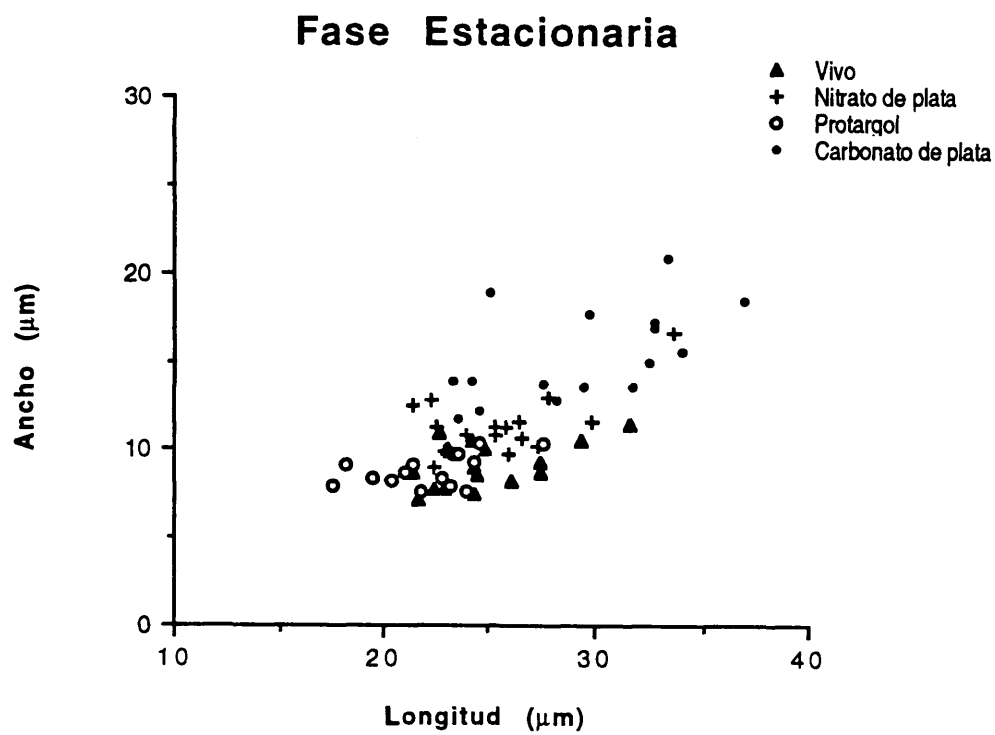


Figura 45.- Longitud frente a anchura celulares medias (μm) en todos los clones estudiados en vivo y tras las impregnaciones con carbonato de plata amoniacal, nitrato de plata y protargol, en ambas fases de crecimiento.

La impregnación con carbonato de plata, como se puede observar produce los efectos más deformantes con respecto a las células en vivo en ambas dimensiones, lo cual es debido principalmente al proceso de preparación de dicha tinción (el cambio de la forma celular es propiciado por la fijación suave con formaldehído, seguida por la impregnación llevada a cabo a 45-60°C y la observación de las células bajo extrema presión del cubre) mientras que las impregnaciones con nitrato de plata y protargol, produjeron efectos menos deformates precisamente porque en el proceso de impregnación las células se manejan fijadas a la superficie del cubre por medio de una matriz de albumina de Mayer (técnica de protargol) o gelatina (técnica de Chatton-Lwoff o de nitrato de plata) en la que se encuentran embebidas. La longitud y anchuras celulares tras el tratamiento con esta impregnación, por lo tanto fueron sobrestimadas en ambas fases. Las células en fase exponencial de crecimiento parecen ser más afectadas que aquéllas en fase estacionaria. La anchura celular es la dimensión más afectada en ambas fases.

Los efectos de la impregnación con nitrato de plata o técnica de Chatton-Lwoff parecen producir deformaciones muy ligeras tanto de dilatamiento como encogimiento dependiendo del clon en cuestión, afectando mayormente, como se observó en el caso anterior, a la anchura celular. Esta dimensión parece ser más afectada en fase estacionaria que en fase exponencial a diferencia de la impregnación anterior. La longitud celular parece ser afectada proporcionalmente en menor grado. Las células en fase exponencial son más afectadas en ésta, siendo las deformaciones producidas en fase estacionaria en algunos casos casi nulas con respecto a las observaciones llevadas a cabo en las células en vivo.

La impregnación con protargol produce generalmente encogimiento en las células dependiendo del clon del que

estemos hablando. El porcentaje de este encogimiento tiende a ser menor en la anchura que en la longitud o del mismo orden en ambas fases de crecimiento, a diferencia de las otras dos impregnaciones estudiadas.

El análisis de la varianza llevado a cabo sobre las variables de longitud y anchura celulares en todos los casos estudiados mostró, en el caso de la variable longitud que las células en fase exponencial fueron un 24.20% más grandes que las células en fase estacionaria ($p < 0.05$).

Las células tras la tinción con nitrato de plata mostraron aproximadamente la misma longitud que las células en vivo (0.52% mayores) de forma significativa ($p < 0.05$), mientras que las células tras el tratamiento con carbonato de plata amoniacal mostraron un incremento en la longitud de aproximadamente 25.67% ($p < 0.05$). El tratamiento con protargol, sin embargo, produjo una disminución en la longitud celular de aproximadamente un 11.14% el encontrado en las células en vivo.

El análisis llevado a cabo sobre la variable anchura celular mostró resultados similares, aunque esta variable es mucho más afectada relativamente que la longitud celular. Así, las células en fase exponencial de crecimiento son de forma muy significativa ($p < 0.001$) un 61.88% más anchas que en fase estacionaria.

La impregnación con carbonato de plata amoniacal produce de forma muy significativa un incremento en esta variable de un 72.46%, lo cual ya indicamos no es sólo producto del tratamiento "per se" de la impregnación sino también del aplastamiento celular que se produce en las preparaciones. La impregnación con protargol produjo un efecto en el mismo sentido que el producido en el caso de la variable longitud aunque sin embargo sobre esta variable el efecto fue menor siendo de forma muy significativa un

6.25% menor que el valor de dicha variable en las células en vivo. La impregnación con nitrato de plata produjo un incremento de forma muy significativa ($p < 0.001$) en la anchura celular de un 16.42%.

Estos resultados por lo tanto muestran que la impregnación con nitrato de plata es la técnica que produce menores deformaciones en las células quedando por lo tanto, las proporciones de ambas dimensiones más cercanas a las observadas en las células en vivo, seguida inmediatamente por la impregnación con protargol y por último la impregnación con carbonato de plata.

Exponencial

Estacionaria

	L	std	A	std	V	std	L	std	A	std	V	std
Um	35.21	3.57	18.08	1.87	6200.79	1919.14	27.51	2.75	9.27	0.96	1264.91	359.4
Us	39.39	4.88	19.28	2.27	7919.20	2746.17	29.36	2.92	10.54	1.03	1749.16	510.8
Pa	32.66	2.75	14.15	1.32	3486.48	874.98	24.79	2.30	9.99	0.80	1317.68	309.9
X2	26.78	2.02	13.70	1.19	2674.46	602.79	21.63	2.18	7.18	0.97	610.36	226.1
Ta	32.41	2.78	15.97	1.36	4402.81	1020.81	22.39	1.59	7.80	0.65	724.50	167.2
AD1	23.17	2.19	11.92	1.16	1756.21	441.70	21.33	1.42	8.63	0.85	847.08	209.7
AD2	28.70	2.05	12.54	1.13	2401.83	570.09	24.33	2.50	7.53	1.05	749.07	285.5
AE21	29.23	2.61	14.03	1.42	3085.98	872.11	26.10	2.91	8.28	1.08	971.24	333.3
AE22	27.94	2.43	16.39	1.11	3975.10	803.15	22.66	1.37	10.89	0.93	1427.45	320.0
SW11	27.93	2.37	15.94	1.56	3787.93	969.60	24.35	2.13	8.95	0.87	1044.72	296.1
Cil1	30.75	2.12	13.19	1.20	2847.35	655.55	24.42	2.36	8.56	0.81	958.51	259.7
BBCil	32.69	2.97	13.75	1.39	3307.84	893.15	27.46	2.81	8.73	0.85	1124.64	295.7
Cil7	24.65	1.60	13.38	1.19	2345.73	528.84	22.88	1.32	7.71	0.54	719.85	133.5
Cil3	35.15	2.55	19.12	2.31	6908.06	2122.81	31.60	2.44	11.41	1.39	2210.53	661.4
SRBM	28.83	3.19	14.67	1.77	3329.56	1032.05	24.13	1.95	10.49	0.80	1411.40	327.5
SC21	27.51	2.01	16.19	1.27	3822.11	784.09	23.10	1.73	10.00	0.95	1222.58	258.8

Tabla 7.- Datos medios y desviación standard de la longitud, anchura y volumen celulares *in vivo*. (L y A en μm , V en μm^3).

	L	std	A	std	M1	std	M2	std	M3	std
Um	46.69	4.38	31.39	3.47	2.38	0.46	2.91	0.33	1.59	0.28
Us	44.85	5.13	25.73	4.82	2.43	0.33	2.76	0.32	1.51	0.28
Pa	45.32	4.70	28.80	3.97	3.39	0.53	3.40	0.38	1.73	0.26
X2	35.68	2.44	24.14	3.60	2.29	0.27	2.45	0.27	1.56	0.22
Ta	39.70	2.93	20.93	2.67	2.56	0.23	2.72	0.20	1.64	0.23
AD1	34.28	2.43	24.61	2.34	2.77	0.24	2.46	0.18	1.84	0.21
AD2	39.02	3.75	23.32	3.69	2.35	0.31	2.50	0.22	1.64	0.24
AE21	39.84	4.15	23.75	3.25	1.96	0.27	2.29	0.23	1.58	0.24
AE22	29.32	3.17	22.93	2.92	2.36	0.33	2.51	0.22	1.70	0.25
SWil	38.08	4.25	29.67	3.69	4.44	0.53	2.98	0.26	1.75	0.27
Cil1	45.00	0.34	29.25	4.11	2.50	0.34	2.60	0.28	1.59	0.21
BBcil	51.11	4.66	32.92	3.83	2.37	0.32	2.61	0.29	1.56	0.27
Cil7	48.83	5.87	34.86	7.31	2.88	0.50	3.18	0.35	1.81	0.20
Cil3	45.19	4.07	31.20	3.33	2.02	0.26	2.65	0.23	1.45	0.28
SRBM	36.11	3.16	26.38	3.20	2.46	0.25	2.33	0.21	1.72	0.25
SC21	36.36	2.82	29.01	3.14	2.62	0.27	2.50	0.22	1.74	0.21

Tabla 8.1.- Datos medios y desviación standard tras de la impregnación con carbonato de plata amoniacoal de los clones en fase exponencial (μm).

	Pa	std	B	std	L-Ma	std	A-Ma	std	L-Mi	std
Um	9.92	0.75	17.48	1.38	9.62	1.66	11.98	2.48		
Us	9.27	0.73	16.65	1.13	12.87	1.45	15.46	2.48		
Pa	10.14	0.85	16.61	1.35	10.24	1.15	11.44	1.32		
X2	8.26	0.50	14.67	0.80	8.71	1.05	9.84	1.19	3.26	0.45
Ta	8.28	0.48	14.76	0.81	10.73	1.01	11.89	1.05		
AD1	9.78	0.65	15.65	0.99	9.87	0.84	12.26	1.32		
AD2	8.56	0.70	15.65	1.45	8.94	1.03	10.81	1.73		
AE21	8.20	0.64	15.26	1.19	8.63	0.86	9.53	1.09	2.49	0.31
AE22	9.14	0.56	14.82	0.95	10.88	1.43	12.82	1.93		
SWil	9.58	0.56	18.64	1.42	10.92	1.27	12.80	1.94	4.36	0.62
Cil1	8.94	0.57	16.91	1.36	10.02	1.06	11.80	1.71		
BBcil	8.86	0.72	17.54	1.47	10.24	0.98	11.44	1.58	2.98	0.50
Cil7	10.13	0.70	17.49	1.44	12.76	1.83	14.88	2.21	3.75	0.91
Cil3	8.64	0.43	17.84	0.91	13.10	1.86	13.95	1.90	3.61	0.76
SRBM	8.10	0.50	14.30	1.01	11.62	1.15	12.00	1.18	2.32	0.44
SC21	8.83	0.44	15.31	0.96	12.60	1.36	13.95	1.90	3.06	0.55

Tabla 8.2.-

Datos medios y desviación standard tras la impregnación con carbonato de plata amoniacal de los clones en fase exponencial en μm (continuación)

	A-Mi	std	Ap-M1	std	M1-M2	std	PA-P	std
Um			7.66	1.35	4.07	0.82	22.55	3.19
Us			6.39	1.12	3.86	0.72	24.26	4.12
Pa			3.15	0.72	1.77	0.41	29.10	4.16
X2	3.51	0.42	5.18	1.11	3.10	0.57	18.13	2.31
Ta			4.80	0.94	2.63	0.52	21.15	2.61
AD1			3.59	0.49	2.36	0.49	17.13	2.20
AD2			5.73	0.71	3.72	0.82	19.92	2.74
AE21	2.63	0.34	4.97	1.60	4.25	0.63	20.15	3.20
AE22			4.46	1.21	2.56	0.55	12.88	2.18
SWi1	5.05	0.43	5.00	1.51	3.12	0.76	13.75	3.60
Cil1			7.17	1.12	4.33	0.85	23.39	3.36
BBcil	3.33	0.52	6.76	1.38	5.17	0.75	28.51	3.68
Cil7	4.17	0.87	5.96	1.27	3.06	0.69	27.43	4.03
Cil3	3.93	0.66	6.11	1.05	6.59	0.66	22.70	3.07
SRBM	3.12	0.35	4.11	1.00	3.08	0.62	18.60	2.62
SC21	3.70	0.44	4.83	1.10	3.20	0.62	19.81	2.76

Tabla 8.3.- Datos medios y desviación standard tras la impregnación con carbonato de plata amoniacal de los clones en fase exponencial en μm (continuación)

	L	std	A	std	M1	std	M2	std	M3	std
Um	23.50	4.71	11.75	2.48	1.97	0.27	2.25	0.28	1.38	0.23
Us	32.78	2.94	16.92	1.93	2.26	0.32	2.54	0.21	1.77	0.22
Pa	33.99	3.45	15.51	1.72	2.82	0.27	3.06	0.24	1.58	0.21
X2	24.53	2.28	12.18	1.48	2.02	0.22	2.33	0.25	1.45	0.36
Ta	27.57	1.93	13.65	1.04	2.33	0.25	2.65	0.23	1.53	0.22
AD1	23.31	1.61	13.84	1.27	2.35	0.21	2.30	0.17	1.66	0.14
AD2	29.54	2.38	13.55	1.77	1.96	0.20	2.24	0.18	1.56	0.23
AE21	28.20	3.30	12.80	1.77	1.89	0.29	2.29	0.24	1.51	0.19
AE22	25.01	3.07	18.86	2.47	2.28	0.28	2.31	0.27	1.52	0.31
SW11	24.15	2.37	13.89	1.98	3.80	0.55	2.76	0.31	1.63	0.21
C111	32.48	3.77	14.97	2.02	2.09	0.26	2.47	0.18	1.65	0.19
BBc11	31.71	3.34	13.57	2.21	1.98	0.24	2.35	0.26	1.49	0.22
C117	32.76	2.73	17.21	2.12	2.46	0.24	2.63	0.22	1.56	0.22
C113	37.01	5.08	18.48	3.17	1.69	0.22	2.73	0.32	1.49	0.27
SRBM	33.45	3.50	20.82	2.49	2.41	0.37	2.64	0.33	1.61	0.22
SC21	29.77	1.78	17.67	1.67	2.24	0.39	2.50	0.27	1.51	0.26

Tabla 9.1.- Datos medios y desviación standard tras la impregnación con carbonato de plata amoniacal de los clones en fase estacionaria en μm .

	Pa	std	B	std	L-Ma	std	A-Ma	std	L-Mi	std
Um	6.84	0.70	11.12	0.99	6.61	0.90	7.78	1.41		
Us	8.46	0.62	14.58	0.99	10.18	0.85	11.12	1.06		
Pa	9.05	0.64	14.05	0.89	9.46	1.14	10.73	1.40		
X2	7.59	0.52	11.88	0.72	6.93	0.69	7.90	0.88	2.56	0.42
Ta	8.80	0.64	13.29	0.77	8.98	0.84	10.67	1.03		
AD1	7.82	0.42	12.19	0.67	8.15	0.82	8.64	0.76		
AD2	7.63	0.47	12.83	0.80	7.39	0.59	8.93	1.00		
AE21	7.26	0.70	12.45	1.05	8.31	0.76	9.17	0.91	2.35	0.28
AE22	9.08	0.68	13.90	0.98	10.69	1.64	11.79	1.67		
SW11	8.91	0.60	14.99	1.18	11.21	2.02	11.09	1.72	4.11	0.60
Ci11	8.30	0.55	14.33	0.91	9.10	0.76	10.25	1.22		
BBcil	7.66	0.77	13.39	1.17	7.36	1.38	8.11	1.68	2.35	0.36
Ci17	8.61	0.59	14.09	0.92	9.88	0.90	10.88	1.06	2.99	0.42
Ci13	8.85	0.86	16.47	1.81	15.18	2.29	14.48	3.01	3.21	0.56
SRBM	9.58	0.93	15.05	1.30	9.86	1.31	10.56	1.63	2.36	0.42
SC21	9.47	0.72	14.59	1.01	9.73	1.13	9.43	1.14	2.31	0.28

Tabla 9.2.-

Datos medios y desviación standard tras la impregnación con carbonato de plata amoniacoal de los clones en fase estacionaria en μm (continuación).

	A-Mi	std	Ap-M1	std	M1-M2	std	PA-P	std
Um			4.15	0.76	1.32	0.46	8.75	2.71
Us			4.84	0.74	2.93	0.71	13.86	1.96
Pa			2.37	0.63	1.08	0.29	18.57	2.56
X2	3.53	0.42	4.26	0.56	1.41	0.30	9.12	1.83
Ta			4.59	0.45	1.30	0.28	10.84	1.33
AD1			2.56	0.45	1.38	0.25	8.80	1.28
AD2			4.55	0.57	2.45	0.42	13.21	1.55
AE21	3.14	0.34	5.26	0.73	2.43	0.65	11.33	2.35
AE22			2.98	0.69	2.12	0.50	9.41	1.92
SWi1	5.58	0.83	4.09	0.86	1.10	0.26	5.24	1.47
Cil1			5.30	0.78	2.99	0.66	13.25	2.58
BBcil	3.05	0.50	5.11	0.59	2.79	0.59	14.12	2.45
Cil7	3.68	0.36	4.73	0.73	1.83	0.40	15.04	2.22
Cil3	3.65	0.62	5.19	1.00	5.49	1.10	16.14	3.35
SRBM	2.87	0.45	4.05	0.81	2.42	0.59	15.32	2.64
SC21	2.58	0.27	3.48	0.76	2.04	0.50	12.80	1.44

Tabla 9.3.- Datos medios y desviación standard tras la impregnación con carbonato de plata amoniacal de los clones en fase estacionaria en μm (continuación)

	L	std	A	std	M1	std	M2	std	M3	std
Um	29.51	2.17	14.07	1.05	1.86	0.18	1.95	0.15	1.28	0.11
Us	33.99	3.25	19.80	1.86	2.05	0.21	2.27	0.26	1.39	0.16
Pa	31.58	2.34	16.37	1.14	2.70	0.25	2.87	0.17	1.42	0.19
X2	23.72	1.89	15.97	1.47	1.72	0.19	1.91	0.26	1.17	0.18
Ta	36.07	3.16	20.10	2.05	2.24	0.30	2.66	0.27	1.32	0.21
AD1	25.57	1.91	16.88	1.71	1.96	0.18	1.93	0.12	1.36	0.13
AD2	30.34	1.86	15.45	1.31	1.96	0.22	2.03	0.17	1.35	0.16
AE21	30.30	2.22	15.39	1.30	1.90	0.23	1.92	0.14	1.35	0.13
AE22	25.49	2.61	18.47	2.06	1.93	0.23	2.21	0.15	1.32	0.12
SWil	25.50	2.11	15.74	1.77	3.28	0.36	2.55	0.20	1.18	0.19
Cil1	31.33	2.32	15.02	1.55	2.03	0.28	1.97	0.19	1.31	0.17
BBcil	33.65	3.16	14.34	1.07	1.99	0.17	1.91	0.17	1.32	0.16
Cil7	27.58	1.71	14.76	1.24	2.30	0.22	2.38	0.17	1.40	0.18
Cil3	37.20	2.72	21.34	2.21	1.56	0.15	2.26	0.13	1.25	0.14
SRBM	27.99	2.70	15.12	1.85	1.62	0.25	1.68	0.17	1.06	0.18
SC21	27.38	2.93	15.61	2.09	1.70	0.20	1.66	0.17	0.98	0.22

Tabla 10.1.- Datos medios y desviación standard tras la impregnación con nitrato de plata o técnica de Chatton-Lwoff de los clones en fase exponencial en μm .

	Pa	std	B	std	Ap-M1	std	M1-M2	std	Pa-P	std
Um	6.84	0.26	11.83	0.60	5.06	0.66	2.38	0.49	13.15	1.68
Us	7.27	0.51	13.26	0.91	5.63	1.31	3.08	0.65	15.89	3.43
Pa	7.09	0.44	11.84	0.50	2.27	0.67	0.80	0.23	17.91	2.19
X2	6.74	0.50	10.99	0.65	4.56	0.79	1.97	0.51	9.13	1.82
Ta	7.44	0.53	12.96	0.73	5.08	1.10	2.29	0.55	18.93	2.73
AD1	6.82	0.37	11.37	0.60	3.42	1.06	1.91	0.37	11.37	1.62
AD2	6.98	0.41	12.37	0.60	4.71	0.87	2.83	0.35	13.65	1.48
AE21	6.71	0.35	12.23	0.64	5.11	0.67	2.99	0.38	13.30	1.88
AE22	7.49	0.39	12.49	0.77	3.32	0.69	2.30	0.44	10.69	2.44
SWi1	7.43	0.34	12.99	0.71	4.36	0.76	1.22	0.29	8.70	1.94
Ci11	7.06	0.35	12.84	0.67	5.69	0.81	2.95	0.35	13.20	1.75
BBcil	6.80	0.39	12.63	0.89	5.38	0.87	3.12	0.76	15.96	2.11
Ci17	7.19	0.36	11.86	0.49	4.71	0.71	1.25	0.26	11.41	1.50
Ci13	7.56	0.30	15.19	0.75	5.75	0.78	5.73	0.57	17.03	2.07
SRBM	6.99	0.31	11.04	0.73	3.28	0.69	1.83	0.47	14.03	1.77
SC21	6.66	0.60	11.22	0.93	3.07	0.75	1.87	0.59	13.48	1.77

Tabla 10.2.- Datos medios y desviación standard después de la impregnación con nitrato de plata o técnica de Chatton-Lwoff de los clones en fase exponencial en μm .
(continuación)

	L	std	A	std	M1	std	M2	std	M3	std
Um	26.54	1.80	10.65	0.82	1.78	0.21	1.94	0.16	1.29	0.15
Us	29.89	2.33	11.64	0.94	2.05	0.24	2.13	0.21	1.31	0.14
Pa	26.48	2.25	11.57	1.02	2.32	0.19	2.77	0.20	1.33	0.17
X2	22.37	1.72	9.06	0.91	1.66	0.21	1.85	0.19	1.16	0.17
Ta	27.87	2.51	13.02	1.34	2.20	0.16	2.47	0.18	1.28	0.12
AD1	22.34	1.32	12.84	1.29	1.87	0.16	1.80	0.18	1.27	0.13
AD2	25.34	2.44	10.86	0.97	1.71	0.20	1.86	0.17	1.24	0.15
AE21	25.99	2.34	9.80	1.12	1.81	0.18	1.76	0.15	1.22	0.12
AE22	21.45	1.31	12.42	1.31	1.69	0.19	2.07	0.13	1.32	0.12
SW11	23.93	1.78	10.84	1.12	3.15	0.48	2.44	0.22	1.12	0.14
Ci11	25.31	1.70	11.21	1.09	1.76	0.18	1.87	0.15	1.29	0.11
BBcil	27.28	2.60	10.22	0.95	1.81	0.17	1.84	0.20	1.29	0.09
Ci17	25.83	1.91	11.20	1.05	2.20	0.22	2.26	0.27	1.35	0.18
Ci13	33.68	2.42	16.66	1.41	1.42	0.16	2.24	0.15	1.23	0.15
SRBM	22.85	2.26	9.87	1.23	1.58	0.22	1.68	0.20	0.99	0.20
SC21	22.49	1.75	11.25	1.10	1.51	0.26	1.64	0.15	0.95	0.15

Tabla 11.1.- Datos medios y desviación standard tras la impregnación con nitrato de plata o técnica de Chatton-Lwoff de los clones en fase estacionaria en μm .

	Pa	std	B	std	Ap-M1	std	M1-M2	std	Pa-P	std
Um	6.64	0.38	11.17	0.65	5.15	0.62	1.96	0.50	10.45	1.35
Us	6.99	0.31	12.60	0.62	5.24	0.70	2.78	0.38	12.53	1.85
Pa	7.04	0.52	11.20	0.48	2.47	0.58	0.61	0.13	13.12	1.89
X2	6.05	0.39	10.25	0.54	4.49	0.50	1.79	0.36	8.08	1.37
Ta	7.19	0.28	11.72	0.56	5.33	0.47	1.32	0.27	11.16	2.06
AD1	6.50	0.29	10.49	0.48	3.43	0.48	1.44	0.30	8.89	1.00
AD2	6.37	0.31	10.90	0.85	4.67	0.59	2.15	0.62	10.06	1.58
AE21	6.29	0.28	11.15	0.65	5.18	0.70	2.42	0.43	10.01	1.48
AE22	6.89	0.39	11.20	0.64	2.93	0.58	1.50	0.43	7.75	1.12
SW11	7.19	0.29	12.39	0.74	4.60	0.75	0.87	0.18	7.19	1.29
Cil1	6.82	0.27	11.32	0.51	5.81	0.61	1.94	0.42	8.37	1.28
BBcil	6.36	0.37	11.51	0.80	5.20	0.53	2.43	0.61	10.73	1.86
Cil7	6.70	0.43	10.93	0.59	5.14	0.57	1.04	0.19	10.00	1.36
Cil3	7.47	0.26	14.32	0.79	5.62	0.91	5.06	0.70	14.34	1.59
SRBM	7.12	0.33	11.05	0.68	3.01	0.50	1.57	0.37	9.02	1.65
SC21	7.01	0.47	10.97	0.55	2.86	0.49	1.61	0.38	9.16	1.26

Tabla 11.2.- Datos medios y desviación standard tras la impregnación con nitrato de plata o técnica de Chatton-Lwoff de los clones en fase estacionaria en μm . (continuación)

	L	std	A	std	L-Ma	std	A-Ma	std	L-ma	std
Um	25.05	1.97	10.53	1.07	5.86	0.83	5.88	0.78	4.51	0.82
Us	26.56	2.34	14.96	1.58	6.95	1.00	6.99	1.15	6.05	0.99
Pa	31.89	2.34	16.04	1.21	6.70	1.46	7.41	1.25	5.43	1.38
X2	23.07	1.51	11.96	0.95	5.63	0.48	5.10	0.61	4.48	0.60
Ta	23.69	1.23	10.88	1.13	7.37	1.01	5.37	0.70	6.30	0.79
AD1	22.20	1.74	11.27	1.08	5.13	1.07	6.55	0.91	3.83	0.96
AD2	24.57	1.77	12.77	1.08	5.49	0.59	5.78	0.66	4.70	0.64
AE21	27.39	1.42	11.54	0.71	6.55	0.79	6.43	0.73	5.75	0.95
AE22	21.88	2.08	13.33	1.07	5.74	0.74	6.72	0.90	5.14	0.90
SWi1	29.76	3.04	18.24	1.92	7.13	1.19	9.52	1.14	6.51	1.33
Ci11	28.15	2.65	14.23	1.58	6.47	1.02	6.44	1.06	5.29	0.96
BBci1	30.47	3.19	13.07	1.85	7.03	0.91	6.42	0.99	6.32	0.86
Ci17	33.89	2.63	17.38	1.51	8.19	1.06	8.68	1.16	6.42	1.19
Ci13	28.92	2.78	18.54	2.12	8.25	1.78	8.84	1.12	6.59	1.63
SRBM	27.32	1.85	14.30	1.29	7.24	0.92	8.19	1.17	5.12	0.90
SC21	25.08	2.22	15.37	1.78	6.62	0.93	7.24	1.26	4.76	0.84

Tabla 12.1.- Datos medios y desviación standard tras la impregnación con protargol de los clones en fase exponencial en μm .

	A-ma	std	L-Mi	std	A-Mi	std	L-mi	std	A-mi	std
Um	3.74	0.72								
Us	5.57	1.11								
Pa	5.56	1.00								
X2	3.49	0.50								
Ta	3.51	0.60								
AD1	4.17	0.81								
AD2	4.78	0.86								
AE21	4.81	1.06								
AE22	5.88	1.32								
SWi1	8.75	1.76	1.81	0.38	2.47	0.59				
Ci11	4.65	0.90								
BBci1	5.39	1.20								
Ci17	6.46	1.25								
Ci13	7.19	1.10								
SRBM	5.62	0.97								
SC21	5.29	1.02								

Tabla 12.2.- Datos medios y desviación standard tras la impregnación con protargol de los clones en fase exponencial en μm .
(continuación)

	L	std	A	std	L-Ma	std	A-Ma	std	L-ma	std
Um	23.19	1.64	7.99	0.68	6.60	0.57	4.62	0.52	5.75	0.59
Us	23.27	1.16	9.76	0.71	6.76	0.85	5.22	0.58	5.78	1.02
Pa	27.65	2.73	10.38	1.12	6.90	0.75	6.09	1.04	6.24	0.86
X2	20.34	1.80	8.30	0.80	5.26	0.68	4.76	0.52	4.51	0.55
Ta	22.74	1.77	8.33	0.62	6.42	0.79	4.90	0.58	5.63	0.89
AD1	19.49	1.42	8.40	0.77	6.44	0.57	4.91	0.60	5.45	0.58
AD2	21.72	1.45	7.55	0.61	4.92	0.43	4.09	0.50	4.53	0.41
AE21	21.81	1.44	7.66	0.45	5.19	0.47	4.00	0.54	4.33	0.50
AE22	17.57	1.17	7.87	0.88	6.72	0.57	4.52	0.66	5.97	0.69
SWi1	21.34	2.07	9.15	1.06	6.92	0.89	5.75	0.88	5.52	0.61
Ci11	24.25	1.79	9.27	0.86	6.14	0.59	4.66	0.61	5.02	0.53
BBci1	23.94	1.86	7.63	0.60	6.03	0.58	4.47	0.58	5.44	0.59
Ci17	23.56	1.26	9.80	0.67	8.01	0.64	5.90	0.78	6.71	0.61
Ci13	24.56	1.83	10.40	1.27	8.72	1.05	6.18	0.86	7.12	1.03
SRBM	21.04	1.25	8.67	0.62	7.29	0.83	5.94	0.60	5.65	0.84
SC21	18.27	1.25	9.11	0.79	6.78	0.72	5.38	0.55	6.16	0.88

Tabla 13.1.- Datos medios y desviación standard tras la impregnación con protargol de los clones en fase estacionaria en μm .

	A-ma	std	L-Mi	std	A-Mi	std	L-mi	std	A-mi	std
Um	2.53	0.38								
Us	3.19	0.42								
Pa	4.83	0.76								
X2	2.90	0.52	1.40	0.20	1.34	0.17				
Ta	3.31	0.49								
AD1	3.12	0.59								
AD2	2.65	0.57								
AE21	2.40	0.44								
AE22	2.77	0.52								
SWi1	3.04	0.35	2.39	0.30	3.18	0.37	1.55	0.20	1.77	0.21
Ci11	3.08	0.59								
BBcil	3.00	0.75								
Ci17	2.71	0.29	1.96	0.19	2.35	0.35	1.15	0.12	1.27	0.15
Ci13	3.25	0.58	2.29	0.67	2.32	0.64	1.23	0.33	1.25	0.33
SRBM	4.28	0.44								
SC21	4.60	0.60								

Tabla 13.2.- Datos medios y desviación standard tras la impregnación con protargol de los clones en fase estacionaria en μm .

4.3.2. Diferencias entre fases de crecimiento: exponenciales y estacionarias

Los cambios morfológicos más notables observados durante la primera parte del estudio morfológico en condiciones de cultivo estático (en batch), permitieron la localización sobre las curvas de crecimiento de dichos cambios, esto es, en las fases exponencial y estacionaria. En efecto, el volumen celular incrementó aproximadamente de dos a seis veces (Tabla 2), al final de la fase de latencia o comienzo de la fase exponencial, permaneciendo así hasta el final de dicha fase en que disminuye de nuevo al llegar la fase estacionaria (Lámina 1). Los datos recogidos en ambas fases sobre células impregnadas y vivas fueron comparados por medio de análisis de la varianza (ANOVA) como ya se ha observado en material y métodos.

El análisis de la varianza llevado a cabo sobre las variables de longitud y anchura celulares en todos los casos estudiados mostró para el caso de la longitud que las células en fase exponencial fueron un 24.20% más grandes que las células en fase estacionaria ($p < 0.05$).

El análisis llevado a cabo sobre la variable anchura celular mostró resultados similares, aunque parece que esta variable es mucho más afectada relativamente que la longitud celular. Así las células en fase exponencial son un 61.88% más anchas que en fase estacionaria ($p < 0.001$).

Los efectos en el caso de las otras variables estudiadas no pudieron ser comparados con las células en vivo directamente ni en todos las impregnaciones, así que su relación se estudio con las variables longitud y anchura, que sí eran comunes a todos los tratamientos y se obtuvieron resultados de manera indirecta para el resto de las variables. El primer paso fue por medio de un análisis de correlación (Pearson) llevado a cabo sobre la matriz de

los valores medios de cada una de las variables en todos los clones. Este estudio se llevo a cabo considerando cada tipo de impregnación independientemente.

Los resultados más sobresalientes obtenidos en el caso de la impregnación con carbonato de plata amoniacal (Tabla 14) indican en ambas fases una correlación positiva muy significativa ($p < 0.01$) alta entre la longitud celular y la distancia entre el extremo posterior de la haplocinetia y el polo posterior (PA-P) (Tabla 14). Otras correlaciones positivas y significativas con la longitud celular son la distancia entre el polo anterior y la policinetia M1 (Ap-M1) sólo en fase exponencial, el tamaño del área bucal (B), el tamaño de la policinetia M2 y la distancia entre las policinetias M1 y M2 (Tabla 14).

Estos resultados indican, por lo tanto, que dichas estructuras probablemente sufren el mismo efecto en dicha impregnación que el observado para la longitud celular con respecto a las células en vivo, esto es, las medidas de éstas en las células impregnadas con esta técnica serán sobrestimadas en ambas fases de crecimiento.

Las correlaciones positivas y significativas asociadas con la anchura celular se refieren a la longitud, el tamaño del área bucal (B) y los tamaños de la policinetia M2, la haplocinetia y la distancia entre la haplocinetia y el polo posterior celular. Estos de nuevo indican áreas celulares relacionadas con el crecimiento celular, como se observó en el caso de la longitud (Tabla 14).

La longitud y anchura del macronúcleo correlacionaron positivamente de forma significativa con la longitud y anchura únicamente en fase estacionaria de crecimiento.

Los resultados obtenidos en el caso de la impregnación con nitrato de plata o técnica de Chatton-Lwoff (Tabla 15)

indican, para las fases exponencial y estacionaria de crecimiento, correlaciones significativamente positivas entre la longitud y la anchura celulares, la distancia del polo anterior a M1 (Ap-M1), el area bucal (B), la distancia interpolicinetia entre M1 y M2 (M1-M2) y la distancia del extremo posterior de la haplocinetia al polo posterior celular (PA-P) (Tabla 15).

La anchura celular en esta impregnación correlaciona positivamente de forma significativa con la longitud como ya se ha indicado anteriormente, con el tamaño del área bucal (B), con la distancia interpolicinetia entre M1 y M2 (M1-M2), con el tamaño de la haplocinetia y sólo en la fase estacionaria con la distancia del extremo posterior de la haplocinetia al polo posterior celular (PA-P) . Estos resultados, como en el caso de la impregnación del carbonato de plata amoniacal, indican, en el caso del crecimiento celular, que áreas son las responsables de éste, siendo éstas - como se puede observar por el coeficiente de correlación altamente significativo, en ambas fases de crecimiento - el área entre el extremo posterior de la haplocinetia y el polo posterior celular (PA-P) y el area bucal (B) (Tabla 15).

Los resultados de la impregnación con protargol en las que además de las variables longitud y anchura celulares sólo se obtuvieron medidas sobre macro y micronúcleo se pueden observar en la tabla de correlaciones. La longitud y anchura están significativamente correlacionadas ($p < 0.01$) entre ellas y tanto con la longitud como con la anchura de los macronúcleos. Los micronúcleos no se incluyeron en el análisis, ya que en la mayoría de los clones no se observó.

Tanto las células en vivo como tras el tratamiento con impregnación de plata presentan crecimiento alométrico ya que no existe una relación lineal mantenida entre las variables de longitud y anchura medidas en ambas fases del

desarrollo. La anchura parece ser la variable que aumenta principal y más rápidamente de una fase a la otra, por lo tanto dicho crecimiento deforma en cierta manera al organismo (Lámina 1).

Correlaciones positivas con la longitud

	Exponencial		Estacionaria	
	r	p	r	p
A	0.721	0.002	0.566	0.022
M2	0.533	0.034	0.528	0.036
B	0.689	0.003	0.693	0.003
L-Ma	-----	-----	0.502	0.047
A-Ma	-----	-----	0.540	0.031
Ap-M1	0.621	0.010	-----	-----
M1-M2	-----	-----	0.666	0.005
PA-P	0.891	0.000	0.920	0.000

Correlaciones positivas con la anchura

	Exponencial		Estacionaria	
	r	p	r	p
L	0.721	0.002	0.566	0.022
M2	0.521	0.039	-----	-----
PA	0.519	0.040	0.816	0.000
B	0.782	0.000	0.769	0.000
L-MA	-----	-----	0.675	0.004
A-MA	-----	-----	0.678	0.004
PA-P	0.558	0.025	-----	-----

Tabla 14.- Resultados del analisis de correlación (coeficientes Pearson) sobre las variables obtenidas con carbonato de plata amoniacal

Correlaciones positivas con la longitud

	Exponencial		Estacionaria	
	r	p	r	p
A	0.500	0.049	0.576	0.019
B	0.715	0.002	0.805	0.000
Ap-M1	0.534	0.033	0.624	0.010
M1-M2	0.637	0.008	0.711	0.002
PA-P	0.895	0.000	0.870	0.000

Correlaciones positivas con la anchura

	Exponencial		Estacionaria	
	r	p	r	p
L	0.500	0.049	0.576	0.019
PA	0.699	0.003	0.636	0.008
B	0.657	0.006	0.707	0.002
M1-M2	0.500	0.049	0.538	0.032
PA-P	-----	-----	0.546	0.029

Tabla 15.- Resultados del analisis de correlación (coeficientes Pearson) sobre las variables obtenidas con nitrato de plata.

4.3.3. Identificación de especies por análisis estadístico multivariantes: CVA

El análisis de canónico de las poblaciones fue aplicado, en primer lugar, a todas las variables obtenidas para todos los clones en vivo, y tras las impregnaciones (nitrato de plata, carbonato de plata y protargol). En segundo lugar, dicho análisis se llevó a cabo sobre las variables obtenidas en los clones pertenecientes al morfotipo 1. La variable perteneciente a los micronúcleos fue omitida tanto en la matriz de los datos para carbonato de plata como en la de protargol, ya que en muchos de los clones no se observó el micronúcleo.

Los resultados obtenidos de este primer análisis, indicaron qué tratamientos, entendiendo por tales las observaciones en vivo o tras la utilización de impregnaciones, fueron los más efectivos o útiles para la identificación o diferenciación morfométrica de los clones estudiados. La representación gráfica de las dos primeras variables canónicas medias que representan las combinaciones lineales de las variables estudiadas para cada uno de los clones, separan estos de la mejor manera posible. Las mejores resoluciones entre los clones en estas representaciones y comparando los resultados con los ya obtenidos en las otras partes de este trabajo, indican los tratamientos más efectivos o útiles para la identificación o diferenciación morfométrica de dichos clones.

Clones en vivo

Las variables canónicas obtenidos del primer análisis sobre los clones en vivo aparecen en la Tabla 16. Esta sólo incluye los resultados de las cuatro primeras variables canónicas ya que éstos explican el 100% de la variación morfométrica observada en todos los clones. La primera

variable canónica reúne a los clones, asociándolos negativamente con las variables de longitud en ambas fases de crecimiento y positivamente con las variables de anchura celular en ambas fases. Las variables obtenidas durante la fase estacionaria de crecimiento en ambos casos (tanto en longitud como anchura celular) parecen tener mayor peso que aquéllas observados durante la fase exponencial. Estos resultados serían de esperar, ya que los valores de dichas variables obtenidos durante la fase exponencial suelen ser más erráticos que aquellos obtenidos en fase estacionaria.

La segunda variable canónica reúne a los clones, asociándolos negativamente con todas las variables estudiadas en ambas fases de crecimiento, sin embargo en este caso parece ser que la anchura celular en ambas fases de crecimiento es más importante, seguida por la longitud y el volumen respectivamente en fase exponencial.

Los resultados de la representación gráfica o proyección canónica de ambas variable canónicas aparecen en la Figura 46 a. Únicamente se han representado las dos primeras variables canónicas (centroides y límites de confianza del 99%) para cada uno de los clones observados en vivo. Los clones pertenecientes al morfotipo 2 quedan separados de los del morfotipo 1, lo cual indica que las observaciones morfológicas llevadas a cabo en un principio tienen un reflejo morfométrico claro. Sin embargo, en este caso ciertas incoherencias surgen en la inclusión cercana del morfotipo 3 (clon Parauronema acutum) a los clones pertenecientes al morfotipo 1 (AD2, AE21, Cil1, BBCil y Ta) mientras que otros de los clones que morfológicamente fueron incluidos en este morfotipo (clones X2 y Cil7 según variaciones de tamaño consideradas durante las dos fases de crecimiento) quedan completamente fuera de dichos grupos morfométricos. El mismo resultado se obtuvo con los clones U.marinum y U.schewiakoffi. Estos resultados pueden ser debidos a la inclusión en el mismo análisis de clones

morfológicamente identificados como diferentes de acuerdo a estructuras que no se consideran en este análisis, en el que datos como longitud y anchura son muy ambiguos en la comparación interespecífica.

Las variables canónicas obtenidas del segundo análisis sobre los clones en vivo pertenecientes al morfotipo 1 aparecen en la Tabla 17. Los resultados de las cuatro primeras variables canónicas explican aquí de nuevo el 100% de la variación observada en los clones pertenecientes al morfotipo 1. La primera variable canónica reúne a los clones, asociándolos positivamente con las variables morfológicas de mayor peso en dicho variable, esto es, la longitud durante la fase exponencial de crecimiento y la anchura celular en ambas fases. Las variables obtenidas durante la fase estacionaria en ambos casos (tanto en longitud como anchura celular) parecen tener mayor peso que aquéllas observadas durante la fase exponencial.

La segunda variable canónica reúne esta vez a los clones, asociándolos negativamente con las variables de longitud en ambas fases de crecimiento, y positivamente con las variables de anchura celular. La fase exponencial en ambos casos presenta mayores coeficientes (para las variables) tanto los negativos como positivos que la fase estacionaria.

La representación gráfica de la primera frente a la segunda variables canónicas de este segundo análisis únicamente sobre el morfotipo 1, aparece en la Figura 46 b. Este análisis agrupa a los clones AD2, AE21, Cil1 y BBCCil, mientras que U.marinum, U.schewiakoffi, y los clones Ta,, X2 y Cil7 quedan separados, como se observó también en el análisis de todos los clones.

VC	1	2	3	4
<hr/>				
Exponencial				
L	-10.092	-2.283	10.086	-5.597
A	5.856	-3.074	-8.326	-0.074
V	0.448	-1.117	-1.133	-0.671
Estacionaria				
L	-11.671	-0.328	-7.780	7.079
A	7.182	-3.345	6.118	-0.014
V	0.800	-0.983	0.910	0.746
<hr/>				
% varianza explicada	45.14	37.86	12.96	4.05
% varianza acumulada	45.14	83.00	95.96	100.00

Tabla 16.- Estructura factorial de las variables canónicas tras el análisis llevado a cabo con todos los clones en vivo. (VC.- Variable canónica; %(1).- varianza explicada, %(2).- % varianza acumulada).

VC	1	2	3	4
<hr/>				
Exponencial				
L	5.371	-12.045	-8.085	2.196
A	1.192	10.268	3.734	0.978
V	0.947	1.354	0.060	0.519
Estacionaria				
L	0.023	-5.829	11.341	8.793
A	2.746	2.389	-3.975	-8.698
V	0.753	0.026	0.134	-1.431
<hr/>				
% varianza explicada	59.76	29.89	7.42	2.92
% varianza acumulada	59.76	89.65	97.07	100.00

Tabla 17.- Estructura factorial de las variables canónicas tras el análisis llevado a cabo con todos los clones del morfotipo 1 en vivo. (VC.- Variable canónica; %(1).- varianza explicada, %(2).- % varianza acumulada).

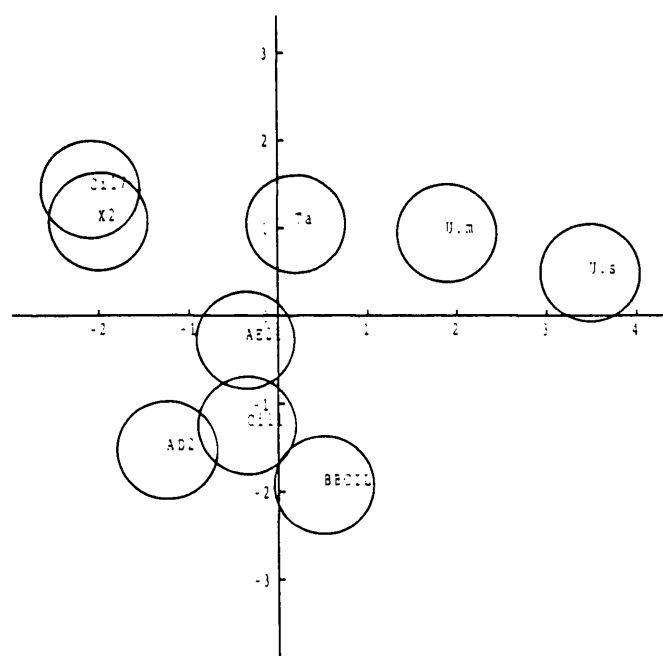
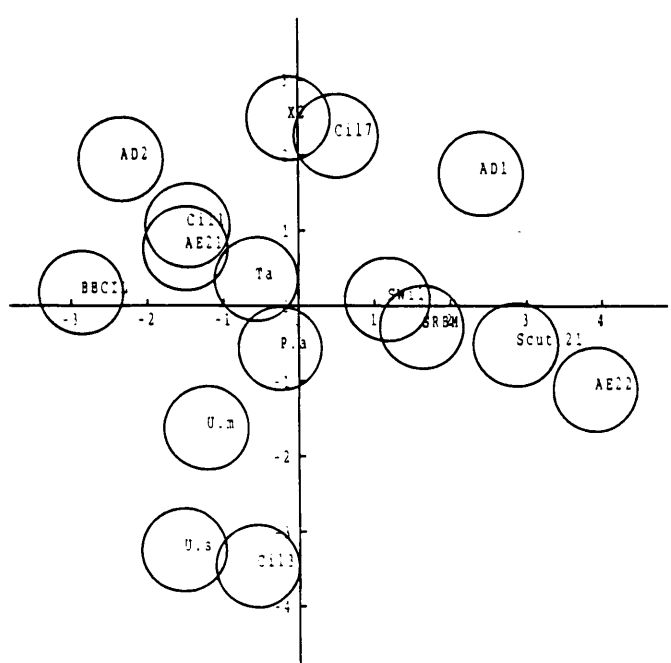


Figura 46.- Resultados de la primera frente a segunda variables canónicas tras el análisis llevado a cabo sobre los clones en vivo. Centroides y límites de confianza (99%). (A).- todos los clones; (B).- morfotipo 1.

Las variables canónicas obtenidas del primer análisis sobre los clones tras el tratamiento con protargol aparecen en la Tabla 18. Los resultados de las nueve primeros variables canónicas explican el 98.90% de la variación observada en todos los clones.

La primera variable canónica reúne los clones, asociándolos negativamente con las variables de longitud en ambas fases de crecimiento y positivamente con las variables de anchura celular y ciertas medidas del macronúcleo en ambas fases. Las variables obtenidas durante la fase estacionaria en ambos casos (tanto en longitud como anchura celular) parecen tener mayor peso que aquéllas observadas durante la fase exponencial.

La segunda variable canónica reúne a los clones de nuevo de la misma manera, asociándolos negativamente con la longitud y anchura celulares y los valores de longitud y anchura macronucleares. La representación gráfica de las dos primeras variables canónicas a través de estas dos variables canónicas aparecen en la Figura 47 a. Los valores morfométricos obtenidos con la impregnación con protargol en este caso parecen separar de nuevo el morfotipo 2 más claramente que el 1. La separación es más precisa en lo que respecta a los clones pertenecientes a los morfotipos 3,4 y 5, que quedan claramente aparte, tanto del morfotipo 1 como del 2. Sin embargo, el clon Cil7 - incluido en el morfotipo 1 - queda tan separado de este morfométricamente por medio de esta impregnación como los morfotipos 3,4 y 5. El clon U. schewiakoffi, como se observó en el caso de los resultados en vivo, parece quedar siempre en una posición lejana al resto del morfotipo 1, esto puede ser debido a que dicho clon siempre suele presentar un mayor tamaño que el resto de los clones estudiados en dicho morfotipo.

El estudio llevado a cabo con los clones pertenecientes al morfotipo 1, presentó los resultados expresados en las variables canónica que aparecen en la Tabla 19. La primera variable canónica, como en el caso del estudio con todos los clones, reúne a éstos asociándolos negativamente con las variables de longitud en ambas fases de crecimiento y positivamente con las variables de anchura celular y ciertas medidas del macronúcleo. Las variables obtenidas durante la fase estacionaria, tanto en longitud como anchura celular, parecen tener mayor peso que aquéllas observadas durante la fase exponencial.

La segunda variable canónica asocia los clones positivamente con las variables de longitud en ambas fases de crecimiento, siendo el coeficiente en fase exponencial mayor que en fase estacionaria. La mayoría del resto de las variables asocian los clones negativamente. La representación gráfica de ambas variables canónicas en la forma de variables canónicas medias, aparece en la Figura 47 b.. Los clones X2, Cil7 y U. schewiakoffi aparecen de nuevo más separados del núcleo principal del morfotipo 1, por medio de las variables obtenidas en esta impregnación.

VC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Exp.	L	-6.951	-5.277	-5.035	-0.046	-5.518	-7.882	5.313	-5.403	2.03
	A	6.027	-3.066	5.859	-6.125	2.297	0.336	-1.660	2.152	-4.99
	L-Ma	0.916	-1.376	-3.190	2.622	-0.323	1.572	-1.205	-2.240	-4.69
	A-Ma	1.253	0.337	-3.111	3.403	1.128	-1.454	-3.360	1.775	3.27
	L-ma	-1.103	0.893	2.946	-0.732	0.557	3.497	-0.111	-1.554	3.49
	A-ma	0.387	-1.006	2.467	-0.431	-3.298	1.714	1.121	0.828	0.21
Sta.	L	-13.793	-6.944	0.748	0.354	3.250	4.961	-3.726	8.109	-2.22
	A	6.039	-0.496	1.344	-3.651	6.610	-3.884	1.253	-6.855	8.33
	L-Ma	6.028	-1.583	-2.846	7.815	-0.053	2.033	-5.272	0.429	3.11
	A-Ma	1.563	-0.390	0.683	3.207	-0.456	-1.472	-0.466	1.012	-6.55
	L-ma	-0.145	0.698	0.323	-3.214	0.755	-0.118	10.174	1.025	-1.44
	A-ma	0.173	1.041	-4.806	-3.752	-1.810	2.280	-0.731	0.362	1.61
% (1)	45.62	23.05	9.45	8.37	3.86	3.27	2.26	1.85	1.11	
% (2)	45.62	68.67	78.12	86.49	90.35	93.62	95.88	97.73	98.99	

Tabla 18.- Estructura factorial de las variables canónicas tras el análisis llevado a cabo con todos los clones tras el tratamiento con protargol. (VC.- Variable canónica; %(1) varianza explicada, %(2).- % varianza acumulada).

VC	1	2	3	4	5	6	7	8
Exp.								
L	-0.583	12.144	1.169	-4.433	-3.538	-2.596	-7.849	5.164
A	4.390	-4.835	7.725	0.887	3.293	1.674	-2.382	-4.806
L-Ma	1.957	-0.223	-3.718	0.482	0.493	-1.501	-0.048	-6.606
A-Ma	1.338	-0.787	-3.979	-0.753	-2.568	0.462	3.885	-3.749
L-ma	-1.537	-0.208	1.372	4.879	-0.550	-2.088	1.448	2.705
A-ma	0.377	1.747	2.139	0.661	1.934	-0.346	2.298	3.366
Sta.								
L	-6.455	8.366	1.314	4.316	1.203	9.270	1.350	-6.351
A	8.222	-5.874	1.781	1.141	-6.912	0.876	2.059	3.831
L-Ma	4.433	1.546	-5.939	0.806	-6.362	1.811	-1.334	4.181
A-Ma	1.706	-0.528	-1.930	-3.770	3.539	-4.165	-1.071	0.497
L-ma	0.771	-1.295	0.292	-1.218	8.785	0.833	1.585	-1.387
A-ma	-1.623	-0.484	-0.694	3.496	-0.256	1.013	-2.483	1.331
% (1)	45.14	22.41	15.20	7.71	3.66	3.39	2.15	0.34
% (2)	45.14	67.55	82.75	90.46	94.12	97.51	99.66	100.00

Tabla 19.-

Estructura factorial de las variables canónicas tras el análisis llevado a cabo con los clones del morfotipo 1 tras el tratamiento con protargol. (VC.- Variable canónica; %(1).- varianza explicada, %(2).- % varianza acumulada).

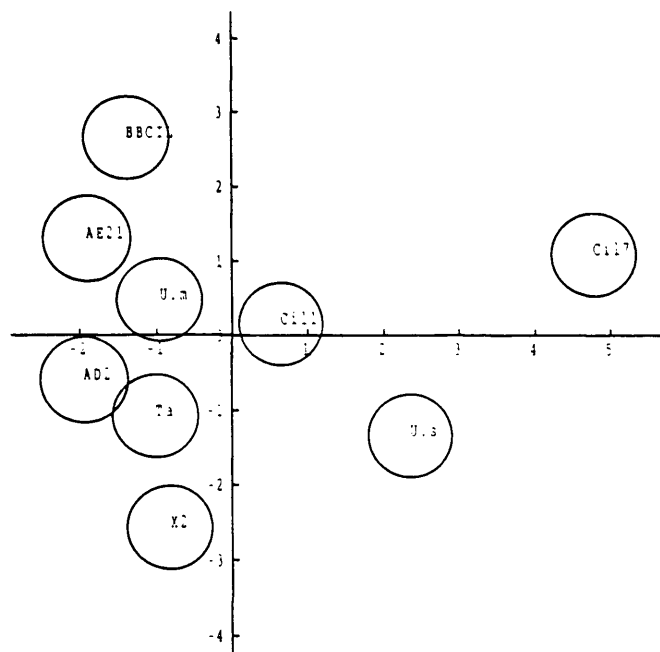
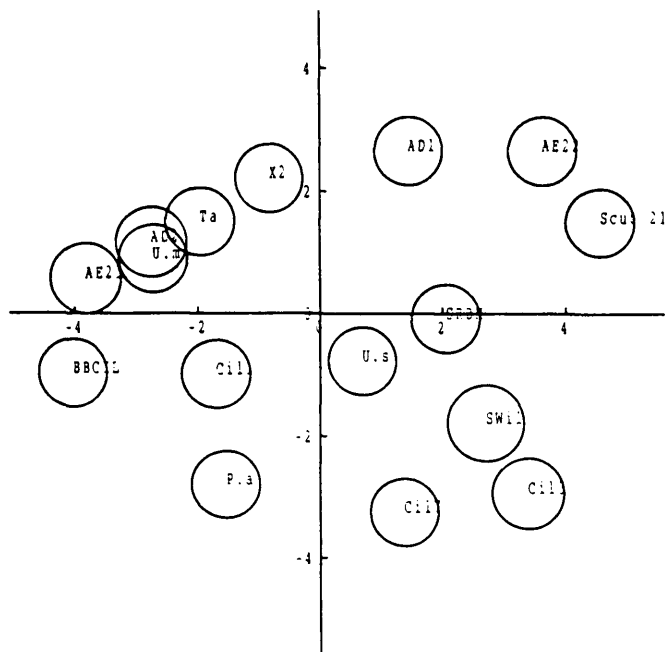


Figura 47.- Resultados de la primera frente a segunda variables canónicas tras el análisis sobre la impregnación con protargol. Centroides y límites de confianza (99%). (A).- todos los clones; (B).- morfotipo 1

Los resultados del análisis llevado a cabo en células tras el tratamiento con nitrato de plata o técnica de Chatton-Lwoff en todos los clones, aparecen en la Tabla 20 que representa nueve de las variables canónicas obtenidos que explican el 99.04% de la variación morfométrica encontrada en dichos clones.

La primera variable canónica reúne a los clones asociándolos negativamente con las variables de longitud en ambas fases de crecimiento (mayor en fase estacionaria), mientras que en segundo lugar y también negativamente parecen ser importantes las variables del tamaño del area bucal en su conjunto (B), y la policinética M2, ambas en fase exponencial de crecimiento. Los clones parecen estar agrupados positivamente con las variables que indican crecimiento celular, como son las distancias entre el polo apical celular y la primera policinética (Ap-M1), la distancia interpolicinética (M1-M2) y la distancia entre el extremo posterior de la haplocinetia y el polo posterior celular (PA-P), principalmente en fase estacionaria de crecimiento.

La segunda variable canónica de nuevo agrupa a los clones cuyas variables están asociadas negativamente con las variables de longitud y tamaño de las policinéticas M1 y M2 en ambas fases de crecimiento, presentando mayores coeficientes y por tanto mayor peso en las variables en la fase estacionaria. Las variables asociadas positivamente al agrupamiento de los clones en esta variable canónica son por orden de importancia: 1) el tamaño del area bucal en fase estacionaria (B); 2) la anchura celular en ambas fases de crecimiento (A); 3) la distancia del extremo posterior de la haplocinetia al polo posterior celular (PA-P) y 4) el tamaño de la haplocinetia (PA) en fase estacionaria. Las variables obtenidas en fase estacionaria de crecimiento

tienen aquí de nuevo coeficientes positivos mayores en esta segunda variable canónica.

La representación gráfica de las variables canónicas medias de las variables canónicas 1 y 2 aparecen en la Figura 48 a para todos los clones tras la impregnación con nitrato de plata. La resolución entre morfotipos como se puede observar, es la que más se acerca a los resultados obtenidos en los otros planteamientos utilizados en el presente trabajo. Los morfotipos 3, 4 y 5 pertenecientes a los clones Parauronema acutum, Cil3 y SWil respectivamente, aparecen claramente independientes de los morfotipos 1 y 2 que a su vez quedan separados entre ellos.

Los resultados del análisis realizado con los datos procedentes de las impregnaciones con nitrato de plata o técnica de Chatton-Lwoff sobre los clones incluídos dentro del morfotipo 1 en la primera parte de este trabajo se recogen en la Tabla 21. Dicha tabla presenta ocho de las variables canónicas obtenidas que explican el 100% de la variación morfométrica encontrada en dichos clones por medio de esta impregnación.

La primera variable canónica reúne a los clones asociándolos negativamente a las variables de distancias interpolicinetia (M1-M2) en ambas fases de crecimiento. También negativamente parecen ser importantes las variables de la distancia entre el extremo posterior de la haplocinetia y el polo posterior celular (PA-P) en fase estacionaria de crecimiento y la longitud celular en fase exponencial. Los clones están asociados positivamente a las variables del tamaño del area bucal en ambas fases de crecimiento (B) y a la anchura celular en ambas fases de crecimiento, así como a la longitud en fase de crecimiento estacionaria.

La segunda variable canónica agrupa nuevamente, a los

clones cuyas variables están asociadas negativamente con la longitud celular en ambas fases de crecimiento y al tamaño del área bucal (B) en fase estacionaria. Las variables asociadas positivamente al agrupamiento de los clones en esta variable canónica son, por orden de importancia: 1) la anchura celular en fase exponencial de crecimiento (A); 2) la distancia del extremo posterior de la haplocinetia al polo posterior celular (PA-P) en fase estacionaria; 3) el tamaño de la policinetia M2 en fase estacionaria y 4) la distancia interpolicinetia en fase estacionaria de crecimiento (M1-M2).

Los resultados obtenidos para esta impregnación referentes al morfotipo 1 aparecen en la Figura 48 b, que representa la primera frente a la segunda variables canónicas. Se puede observar que los clones X2, Ta y Cil7 quedan fuera del grupo principal formado por el resto de los clones pertenecientes a dicho morfotipo. Estos resultados indican la disparidad morfométrica de dichos clones, la cual se observó durante la primera parte de este estudio. Como se explicará más adelante, estas diferencias morfométricas se encuentran, asimismo, a nivel molecular.

VC	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Exp.									
L	-2.974	-6.400	2.306	15.927	5.527	-3.459	1.083	11.152	-1.18
A	-1.632	5.950	2.743	-5.140	-4.842	6.895	3.214	1.863	1.34
M1	-1.495	-1.748	-2.731	-3.542	0.232	-3.863	1.985	4.495	-1.93
M2	-2.139	-1.750	3.806	-0.201	-4.690	0.404	1.327	1.348	-2.77
M3	0.675	-0.833	0.164	-0.195	-1.771	-1.584	-1.680	0.331	0.08
PA	0.435	1.025	-3.793	-0.609	-3.969	-3.312	8.005	0.083	-10.17
B	-3.726	2.190	12.008	-0.097	10.959	4.885	-19.624	-12.336	14.79
Ap-M1	1.072	-1.247	-0.742	-1.458	0.028	0.646	1.553	-2.642	0.83
M1-M2	3.078	-0.146	-0.424	-1.651	-1.712	-2.139	1.697	2.702	-3.54
PA-P	1.666	0.300	-2.759	-0.652	-1.567	-1.035	2.266	-4.171	-0.49
Sta.	-9.742	-20.632	4.987	5.465	4.970	-0.326	-11.392	-9.582	-19.12
L	0.013	6.516	4.264	-0.091	-1.269	-8.666	2.513	-1.600	3.75
A	-1.530	-3.538	-2.141	-2.704	-1.413	-0.718	2.638	3.982	1.76
M1	-1.511	-2.003	0.827	-0.233	-4.486	3.102	-2.306	-2.101	-3.82
M2	0.510	-1.071	0.425	-0.542	-2.919	-2.147	-2.059	-1.140	-0.52
M3	0.499	3.371	-3.250	0.879	0.927	-0.173	8.904	-2.046	-4.39
PA	-0.316	13.305	12.256	-0.401	17.874	3.874	0.537	5.308	7.76
B	2.778	-1.033	0.567	-2.384	-0.457	0.928	3.319	-0.790	3.74
Ap-M1	3.062	-0.662	-1.146	-0.748	-2.059	0.449	-0.441	1.483	-0.19
M1-M2	2.917	5.059	-3.757	1.423	-4.156	3.359	3.613	4.009	9.79
PA-P									
% (1)	35.77	21.37	14.71	12.73	6.87	2.90	2.33	1.45	0.91
% (2)	35.77	57.14	71.85	84.58	91.45	94.35	96.68	98.13	99.0

Tabla 20.-

Estructura factorial de las variables canónicas tras el análisis llevado a cabo con todos los clones tras el tratamiento con nitrato de plata. (VC.- Variable canónica % (1).- varianza explicada, % (2).- % varianza acumulada).

Exp.	VC	1	2	3	4	5	6	7	8
L		1.407	-20.083	-7.243	-6.596	3.737	-3.133	-10.304	2.178
A		6.333	9.774	-7.062	0.333	-3.995	-1.242	-1.207	1.079
M1		-0.379	-0.806	-0.830	2.480	3.067	-0.544	-3.763	-0.247
M2		2.285	0.054	-4.519	0.575	2.492	0.285	-1.947	-3.722
M3		-1.658	0.012	0.757	-0.506	0.101	3.992	-0.140	-2.784
PA		-0.197	-0.394	-3.631	3.609	8.406	0.507	3.016	2.653
B		7.424	2.056	18.300	-8.159	-23.036	12.730	2.701	7.587
Ap-M1		0.131	1.080	1.430	0.190	-0.754	-2.050	3.203	-0.764
M1-M2		-4.004	-0.044	-4.331	3.426	2.944	-0.159	-1.598	-2.610
PA-P		0.318	2.350	2.707	1.977	2.450	-1.756	5.048	0.405
L	Sta.	3.999	-16.675	2.168	1.072	-15.758	-9.823	7.118	8.954
A		3.689	-1.388	-1.340	8.862	3.529	5.482	0.166	1.582
M1		1.081	1.067	-2.022	-3.697	1.031	0.496	-1.574	-5.980
M2		-0.160	3.357	0.115	-1.880	2.148	-2.296	2.096	0.914
M3		-0.861	-0.283	1.943	-0.339	-1.054	1.388	1.162	1.968
PA		0.990	1.690	-4.097	3.308	0.256	4.429	14.743	-13.077
B		7.691	-6.618	5.702	3.212	-10.023	-4.126	-14.098	15.478
Ap-M1		-0.694	1.690	0.522	-0.500	-0.288	-1.690	-1.956	-5.475
M1-M2		-3.727	2.098	-2.200	-1.649	1.082	1.246	1.849	-1.412
PA-P		-1.663	6.537	-1.237	-6.467	7.652	4.616	-0.137	-5.301
% (1)		46.76	25.84	14.64	5.67	3.96	1.50	1.11	0.53
% (2)		46.76	72.60	87.24	92.91	96.87	98.37	99.48	100.00

Tabla 21.-

Estructura factorial de las variables canónicas tras el análisis llevado a cabo con los clones del morfotipo 1 tras el tratamiento con nitrato de plata. (VC.- Variable canónica; %(1).- varianza explicada, %(2).- % varianza acumulada).

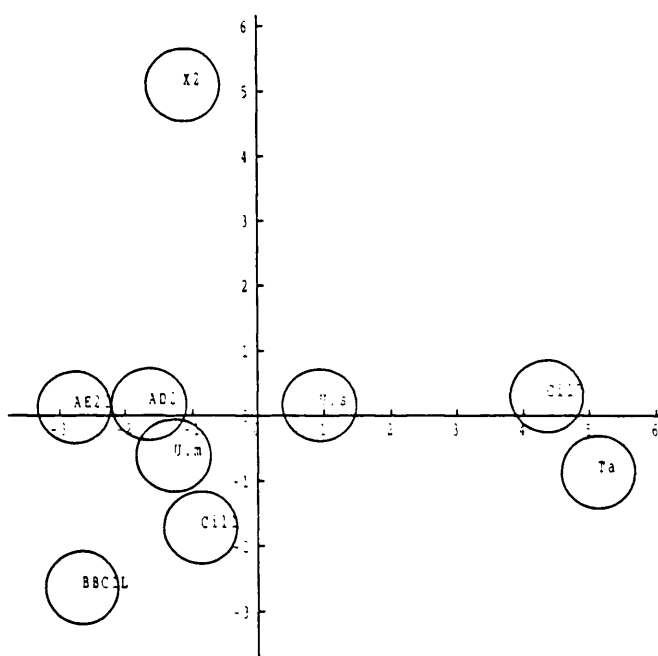
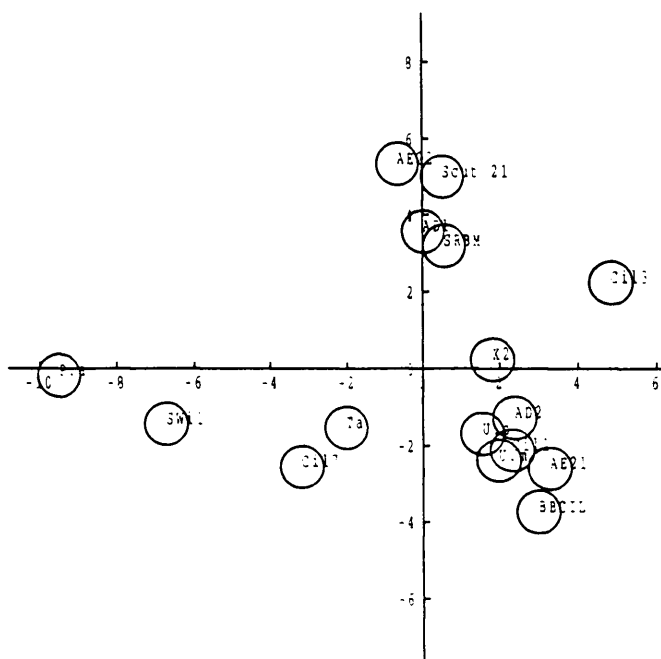


Figura 48.- Resultados de la primera frente a segunda variables canónicas tras el análisis sobre la impregnación con nitrato de plata. Centroides y límites de confianza (99%). (A).- todos los clones; (B).- morfotipo 1.

Los resultados del análisis llevado a cabo con las variables obtenidas en todos los clones por medio de la impregnación con carbonato de plata amoniacal, se presentan en la Tabla 22. Estos resultados incluyen nueve de las variables canónicas obtenidos en el análisis, que contribuyen a la explicación de aproximadamente el 98.45% de la variación morfométrica entre todos los clones estudiados.

La primera variable canónica agrupa los clones asociados negativamente a las variables de longitud en ambas fases de crecimiento (mayor en fase exponencial), al área bucal completa en fase exponencial (B), la policinetia M2 en fase exponencial y con las variables de crecimiento celular como son las distancias entre el polo apical celular y la primera policinetia (Ap-M1), la distancia interpolicinetia (M1-M2) y la distancia entre el extremo posterior de la haplocinetia y el polo posterior celular (PA-P) en fase estacionaria. Los clones quedan agrupados en esta variable canónica positivamente en función de las variables de anchura celular en ambas fases de crecimiento, longitud de la haplocinetia en ambas fases de crecimiento (PA), tamaño del área bucal en fase estacionaria (B) y anchura del macronúcleo en fase exponencial (A-Ma).

La segunda variable canónica agrupa a los clones asociados negativamente con las variables en orden de importancia: 1) la distancia entre policinetias 1 y 2 (M1-M2) en fase exponencial; 2) el tamaño del área bucal en fase estacionaria (B); 3) la longitud del macronúcleo en fase exponencial; 4) las distancias en fase estacionaria entre el polo apical y la policinetia M1 (Ap-M1) y 4) la distancia entre policinetias 1 y 2 (M1-M2).

La representación gráfica en este caso de las

variables canónicas de las variables canónicas primera y segunda para todos los clones estudiados aparecen en la Figura 49 a. Los morfotipos en este caso (como en el caso de la impregnación con nitrato de plata) aparecen separados desde el punto de vista morfométrico, quedando únicamente el morfotipo numero 5 (SWi1) muy cercano al 2, aunque el estudio morfológico clásico es capaz de identificar este clon como diferente del morfotipo 2. Sin lugar a dudas los clones Cil7, Ta y X2 que en el caso de los otros análisis dieron muestras de cierta diferencias morfométricas, aparecen en este caso claramente agrupados morfométricamente en el morfotipo en el que fueron incluidos en la primera parte de este estudio. Esto puede ser debido a que las diferencias con el resto de los clones son tan grandes para las variables estudiadas que las similitudes fuerzan a dichos clones a agruparse. Esta es la razón por la que se llevó a cabo un estudio posterior únicamente con aquellos clones pertenecientes al morfotipo 1.

Los resultados de la impregnación con carbonato de plata en el caso de los clones pertenecientes al morfotipo 1 aparecen en la Tabla 23. Esta tabla incluye ocho de las variables canónicas obtenidas en el análisis, que contribuyen a la explicación del 100% de la variación morfométrica entre los clones de este morfotipo.

La primera variable canónica agrupa los clones asociados negativamente a las variables de longitud del macronúcleo (L-Ma) en ambas fases de crecimiento, la longitud de la haplocinetia (PA) y de la distancia entre el extremo posterior de ésta y el polo posterior (PA-P) en fase exponencial y la haplocinetia (PA) en fase estacionaria. Mientras que están asociadas positivamente a longitud (L) y longitud del área bucal (B), distancia entre policinetias M1 y M2 (M1-M2) en fase exponencial y anchura del macronúcleo y distancia entre policinetias M1

y M2 (M1-M2) en fase estacionaria de crecimiento.

La segunda variable canónica agrupa a los clones asociados negativamente a la longitud (L), longitud del macronúcleo (L-Ma) y tamaño del área bucal (B) en fase estacionaria y longitud (L) y distancia entre el extremo posterior de la haplocinetia al polo posterior celular (PA-P) en fase exponencial. Mientras que están asociadas positivamente con la anchura celular (A) en ambas fases de crecimiento, el tamaño de la haplocinetia (PA) en fase exponencial, la distancia entre el extremo posterior de la haplocinetia al polo posterior celular (PA-P) y el tamaño de la policinetia M1, ambos en fase estacionaria, respectivamente.

Los resultados de la representación de las dos primeras variables canónicas para cada uno de los clones pertenecientes al morfotipo 1 aparecen en la Figura 49 b. Estos resultados, a diferencia del estudio llevado a cabo en todos los clones, separan claramente los clones Cil7 y Ta por un lado y X2 por otro del grupo principal del morfotipo 1, resultado que concuerda de nuevo con los obtenidos en vivo, como por medio de la técnica de protargol y con nitrato de plata. Los clones U. marinum y U. schewiakoffi (como también se observó en vivo y con protargol) se apartan del grupo principal, lo que indica cierta disimilitud morfométrica de dichos clones con el grupo principal. Estos clones fueron más grandes durante todas las fases de crecimiento estudiadas que los clones que forman el grupo principal de este morfotipo (Cil1, BBCil, AE21 y AD2).

VC	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Exp.									
L	-12.788	2.256	-6.523	-0.558	-1.824	-1.745	5.504	2.577	-10.95
A	5.359	-0.713	-0.162	-0.039	6.910	5.257	-1.231	-4.823	0.50
M1	2.260	1.067	0.432	-1.312	-4.746	1.856	-1.541	1.411	1.67
M2	-1.260	-0.148	-0.450	1.275	-0.517	-1.002	1.830	-3.394	0.72
M3	1.089	-0.381	0.039	-0.490	-1.323	0.145	-0.428	0.124	-1.03
Pa	4.451	1.724	6.280	-2.782	1.822	-4.592	8.835	0.005	-2.42
B	-4.643	4.633	-14.395	7.132	14.422	-0.836	-6.649	6.891	6.81
L-Ma	2.344	-1.149	0.454	2.988	-3.123	0.429	2.548	-0.600	-0.74
A-Ma	3.117	-0.532	2.123	0.372	-1.703	-0.706	1.855	1.968	2.15
Ap-M1	-0.739	-0.743	0.446	-1.178	-0.744	0.013	1.583	-0.672	2.47
M1-M2	0.657	-4.340	1.909	-1.852	-2.576	0.435	-0.908	-1.318	-0.91
PA-P	-1.761	2.467	4.004	1.684	-1.686	-0.670	-1.277	0.229	2.84
L	-6.742	3.027	-5.933	0.254	-2.985	6.702	1.366	5.369	-4.00
A	7.293	0.648	5.093	-3.535	2.241	2.751	4.255	0.585	-4.72
M1	0.679	2.191	-0.617	-2.901	-1.681	1.282	1.105	2.773	-2.05
M2	-0.589	0.211	0.500	1.558	0.518	0.127	-2.137	-1.657	-0.58
M3	-0.783	-0.011	-0.510	-0.050	0.216	-0.169	0.898	2.304	-0.81
Pa	2.842	1.023	10.148	-0.300	-4.081	0.038	0.359	-2.099	-0.16
B	2.986	-4.278	-13.888	6.229	2.078	4.660	-4.808	-3.764	10.94
L-Ma	1.401	-2.945	-1.661	4.839	0.676	-2.202	-0.114	-1.847	-1.47
A-Ma	-1.908	0.089	-3.000	1.165	-1.070	-6.010	-1.439	-0.630	0.17
Ap-M1	-1.172	-1.298	-0.744	-0.987	-1.782	0.335	1.696	-1.902	0.03
M1-M2	-0.256	-1.721	2.212	-0.427	0.543	-0.212	0.175	3.012	-0.45
PA-P	-1.910	1.438	4.352	1.545	0.940	-1.161	-1.912	-2.002	2.73
% (1)	39.13	19.56	16.78	9.78	4.28	3.82	2.79	1.67	0.
% (2)	39.13	58.69	75.46	85.25	89.53	93.35	96.14	97.81	98.

Tabla 22.-

Estructura factorial de las variables canónicas tras el análisis llevado a cabo con todos los clones tras el tratamiento con carbonato de plata. (VC.- Variable canónica % (1).- varianza explicada, % (2).- % varianza acumulada).

VC	1	2	3	4	5	6	7	8
Exp.								
L	5.742	-3.204	8.365	-6.915	-17.891	-8.237	-3.421	-1.346
A	0.658	3.715	3.374	1.124	5.082	7.295	1.262	2.691
M1	-1.672	0.256	-4.144	0.036	2.049	-1.460	0.563	1.092
M2	-0.489	0.174	1.090	-0.113	-2.209	-0.533	-1.986	-0.624
M3	-0.460	0.393	-1.466	-0.647	0.001	0.159	-1.463	2.201
Pa	-3.926	3.068	0.689	12.231	-1.618	1.485	-4.508	-2.662
B	4.988	-0.420	12.070	-12.564	3.098	0.006	3.464	6.945
L-Ma	-4.701	-1.623	-0.767	1.536	-0.077	-0.809	1.594	-1.798
A-Ma	-2.813	-0.074	-1.272	2.161	2.101	-1.736	-0.965	-1.008
Ap-M1	0.912	0.174	-0.412	0.767	0.595	-2.157	1.836	1.620
M1-M2	1.758	-1.456	-4.277	3.700	-0.506	0.189	-0.708	-1.636
PA-P	-3.773	-2.279	-2.478	-1.951	4.516	1.397	1.169	-2.619
Sta.								
L	0.725	-8.100	9.111	4.045	-2.658	-2.270	3.104	4.328
A	0.210	5.999	2.934	6.693	4.282	-1.895	0.690	-5.545
M1	-0.435	1.472	0.287	-0.048	2.006	-0.246	-0.927	-1.749
M2	-0.545	0.009	0.352	-0.642	1.059	0.526	0.682	-1.033
M3	0.116	-1.353	0.463	1.526	-0.427	-0.369	-0.232	1.087
Pa	-3.330	0.556	-3.326	0.754	7.819	0.676	-4.464	-3.584
B	-1.783	-3.289	-4.483	-10.169	-7.427	-1.268	17.959	7.989
L-Ma	-5.747	-3.774	0.952	3.225	-3.312	8.298	1.123	-3.587
A-Ma	1.387	0.788	-2.597	-2.267	-4.787	-2.368	-4.415	9.273
Ap-M1	0.177	-0.209	-1.231	-1.655	-1.226	3.003	0.922	-1.040
M1-M2	1.306	-1.949	-0.250	2.119	2.230	-0.195	-1.837	-0.702
PA-P	0.198	1.713	-2.386	-5.493	3.054	0.312	-5.395	-0.966
% (1)	39.05	20.93	16.93	7.77	6.67	4.30	2.31	2.03
% (2)	39.05	59.98	76.91	84.62	91.35	95.65	97.96	100.00

Tabla 23.- Estructura factorial de las variables canónicas tras el análisis llevado a cabo con los clones del morfotipo 1 tras el tratamiento con carbonato de plata. (VC.- Variable canónica; %(1).- varianza explicada, %(2).- % varianza acumulada).

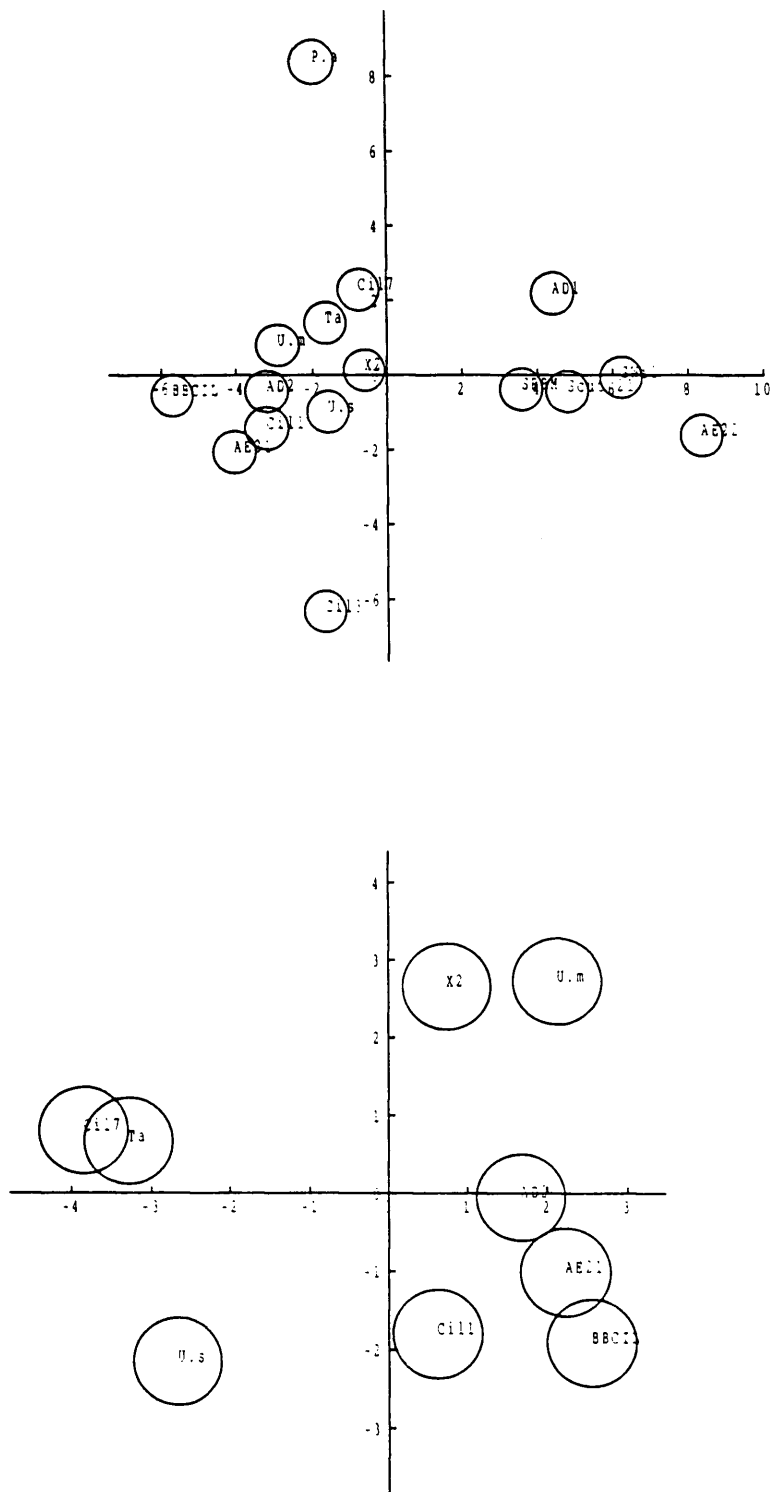


Figura 49.- Resultados de la primera frente a segunda variables canónicas tras el análisis sobre la impregnación con carbonato de plata amoniacal. Centroides y límites de confianza (99%). (A).- todos los clones; (B).- morfotipo 1.

4.4. Hibridaciones con la sonda molecular U.marinum

El proceso de hibridación, para todos los clones estudiados, se llevó a cabo con las sondas moleculares eucariótica universal y específica para U.marinum. Los resultados se muestran en la Tabla 24.

La Lámina 36 corresponde a las observaciones realizadas sobre el proceso de hibridación en el clon Cill1 elegido como ejemplo para ilustrar los resultados obtenidos en estos experimentos. La Lámina 36 a muestra el aspecto de las células tras el proceso de hibridación observadas por medio de contraste de fase. Las Láminas 36 b y 36 c muestran las mismas células observadas tras excitación por medio de luz UV en el microscopio de fluorescencia. La figura 36 b a través del bloque de filtros N2.1 para la detección de tetrametil-rodamina y la figura 36 c a través del bloque I3 para la detección de fluoresceína (FITC). Como ya se ha explicado, la sonda eucariótica universal se marcó con fluoresceína (FITC) y la sonda específica para U. marinum (CCAP 1986/2) con rodamina

Este ejemplo concreto ilustra el caso del clon Cill1 en el que ambas hibridaciones produjeron resultados positivos, esto es, la sonda eucariótica universal marcada con fluoresceína (figura 36c) hibridó con todas las células (Cill1 más P.acutum como control positivo) como ocurrió para todos los clones. La sonda específica para U.marinum marcada con tetrametil-rodamina, en este caso concreto, hibridó con el clon Cill1 (Lámina 36 b) produciendo un resultado positivo, siendo por lo tanto dicha especie identificada con U. marinum. Las células pertenecientes al clon Parauronema acutum (Flechas en Lámina 36 a) utilizado como control negativo en este caso, no hibridaron con la sonda específica para U. marinum (Lámina 36 b). En aquellos casos en que la sonda molecular específica no hibridó, ninguna de las células (ni el clon en estudio, ni el

control P.acutum) se pudieron observar.

Los resultados obtenidos (Tabla 8) muestran como parte de los clones pertenecientes al morfotipo 1, identificado al principio de este trabajo, esto es, U.marinum, U.schewiakoffi, AD2, AE21, Cil1 y BBCil hibridaron con la sonda específica para U.marinum (CCAP 1986/2) marcada con tetrametil-rodamina, indicando en este caso la identidad molecular para el caso de la secuencia utilizada, identidad que fue observada, asimismo, en el estudio por medio de morfología clásica y en el estudio morfométrico.

Los clones X2, Ta y Cil7 que con los métodos morfológicos clásicos incluyeron a estos clones en el morfotipo U.marinum (morfotipo 1), no hibridaron sin embargo con la sonda específica para dicho clon. Esta disimilitud fue observada, asimismo, en el estudio morfométrico (Figuras 48, 49), ya que dichos clones morfométricamente aparecen siempre fuera del grupo principal del morfotipo 1.

Los clones AD1, AE22, SRBM y Scut2.1 pertenecientes todos al morfotipo 2, claramente diferenciado del de U.marinum (morfotipo 1) en el presente estudio, por medio de caracteres utilizados en el estudio morfológico clásico, no hibridaron con la sonda específica. Esta disimilitud molecular fue también encontrada con el estudio morfométrico y con el estudio de las cinéticas de crecimiento de dichos clones.

La no hibridación de los clones SWi1, Cil3 y P.acutum corroboró la disimilitud morfológica, morfométrica y funcional que dichos clones presentan con respecto al morfotipo 1 del clon referencia U.marinum (CCAP 1986/2).

Ciliado	Sonda Eucariotica	Sonda <u>U.marinum</u>
<i>U.marinum</i>	+	+
<i>U.schewiakoffi</i>	+	+
<i>P.acutum</i>	+	-
X2	+	-
Ta	+	-
AD1	+	-
AD2	+	+
AE2.1	+	+
AE2.2	+	-
SW11	+	-
Cil 1	+	+
BBCIL	+	+
Cil 7	+	-
Cil 3	+	-
SRBM	+	-
SC21	+	-

Tabla 24.- Resultados del proceso de hibridación con las sondas moleculares.

(+).- Hibridación
 (-).- No hibridación

5. DISCUSIÓN

5.1.1. Microscopía óptica: impregnaciones

Las especies descritas dentro del género Uronema sólo se pueden comparar en este trabajo, en aquellos casos en los que se utilizó algún tipo de impregnación en la descripción de las estructuras de la infraciliación somática y bucal. Los primeros trabajos en los que se empezaron a utilizar algún tipo de impregnación, por lo tanto comienzan en 1939 con la descripción de Párducz sobre U. marinum (Párducz, B., 1939b).

El trabajo de Párducz, es uno de los primeros lo suficientemente detallado, como para ser utilizado en la extracción de información morfológica para poder comparar, con otras descripciones y con las observaciones llevadas a cabo en el presente trabajo. El organismo descrito por Párducz, procedente de muestras de agua dulce enriquecidas y descrito bajo el nombre de U. marinum, se corresponde, con el morfotipo descrito aquí como 2, esto es con los clones marinos AD1 y AE22 o los de agua dulce SRBM y SCut 2.1. Esta conclusión se alcanzó, comparando los dibujos y la lamina de fotografías que ilustran dicho trabajo. Las descripciones llevadas a cabo por dicho autor presentan la limitación que la impregnación que utilizó le impuso. Las comparaciones en el presente trabajo se han podido llevar a cabo al utilizar precisamente varias impregnaciones, sobrellevando las limitaciones de unas impregnaciones con las otras, situándonos en posición privilegiada para interpretar sus fotografías.

Las observaciones en vivo muestran una célula probablemente en fase estacionaria cuya forma celular es la típica del morfotipo 1, más redondeada y con el casquete anterior más pronunciado que en el morfotipo 1. La posición

del macronúcleo sobre el plano ecuatorial con el micronúcleo adosado anteriormente, en fase estacionaria también es típica de este morfotipo.

La situación de la policinética 1 (M1), con respecto a la última cinética somática, queda justo entre la primera y segunda posiciones cinetosómicas de la última cinética somática. La composición y forma de dicha policinética asimismo, con cinco cinetosomas presenta el cinetosoma central (tercero) desviado ligeramente hacia la última cinética somática (como una llave "}"), es exactamente la observada en los clones pertenecientes a dicho morfotipo. Otros detalles comunes fueron la disposición de la primera y última cinéticas entre ellas y con respecto al resto de las cinéticas somáticas o la primera posición cinetosómica de la primera cinética somática, característica que por otro lado es común al morfotipo 1, queda ocupada por tres cinetosomas, y posteriormente es un cinetosoma más corta que el resto de las cinéticas somáticas. La disposición de líneas argentófilas en el área dorsal celular, entre las cinéticas y las estructuras del área bucal, se corresponden asimismo, con las observadas en los clones pertenecientes al morfotipo 2 con la impregnación con nitrato de plata en el presente trabajo.

Aparecen en 1961 y 1962 dos nuevas descripciones de especies en Uronema: Uronema botuliformis Wenzel, 1961 y Uronema constanziana Tucolesco, 1962 (Tucolesco, J., 1962; Wenzel, F., 1961). Ambas descripciones están basadas en la observación de estos ciliados sin un medio de impregnación, por esta razón no serán utilizadas en este punto.

Los siguientes trabajos en los que se utiliza alguna técnica de impregnación para la identificación de especies dentro del género Uronema aparecen con Borrór en 1963 (Borrór, A.C., 1963a; Borrór, A.C., 1963b).

La primera publicación (A.C. Borrer, 1963b) describe dos organismos, uno identificado con U. marina Dujardin, 1841, y otro con U. acutum Buddenbrock, 1920. Es la primera vez que se utiliza una impregnación en la descripción de especies marinas en este género. Las descripciones a pesar de haber utilizado la impregnación de Chatton-Lwoff, no son muy prolijas en detalle, lo cual no es sorprendente si tenemos en cuenta que con esta impregnación es bastante difícil, como ya hemos indicado, la identificación de cinetosomas individuales en las estructuras bucales, de hecho no se indica la composición de ninguna de las policinetias o haplocinetia.

La descripción del ciliado identificado con U. marina Dujardin, 1841 indica el tamaño de la membrana ondulante que se puede considerar como el tamaño de la haplocinetia, el cual entra dentro del rango de tamaño encontrado en todos los clones (independientemente del morfotipo) estudiados en el presente trabajo. El dibujo presentado para este ciliado en este trabajo nos permite identificar éste con el morfotipo 1 (clones U. marinum, U. schewiakoffi, X2, Ta, AD2, AE21, Cil1, BBCil y Cil 7), principalmente por la forma celular ovalada y por la situación de las estructuras bucales con respecto a las cinetias somáticas. El extremo anterior de la policinetia 1 que está constituido por una línea, parece estar situado por lo menos a nivel de la segunda o tercera posiciones cinetosómicas de la última cinetia somática y por la longitud mostrada parece situarse frente a dos posiciones cinetosómicas. Esta característica es fácilmente identificable en cualquiera de los clones pertenecientes al morfotipo 1. La situación y posición del área bucal, sin embargo, parece corresponderse con una célula en fase exponencial perteneciente a este morfotipo. La descripción del comportamiento, asimismo, es similar a la observada en dicho morfotipo.

La descripción del ciliado identificado con U. acutum,

se corresponde exactamente con el morfotipo 3 (Parauronema acutum). El número de cinetias observado en el presente trabajo en dicho clon (11 cinetias) entra dentro del rango observado por dicho autor (9 a 12 cinetias). Como en nuestras observaciones, la región bucal es más anterior que la de la especie descrita en ese trabajo como U. marina (morfotipo 1). La policinetia 1 (M1) descrita en este trabajo como triangular, es exactamente la forma observable mediante la impregnación con nitrato de plata de las dos líneas que forman en realidad dicha policinetia en P. acutum. El extremo anterior de dicha policinetia está situado justo frente al principio de la última cinetia somática, como ocurre en el clon de Parauronema estudiado en el presente trabajo, frente a la primera posición cinetosómica de la última cinetia somática.

La policinetia 2 (M2) como también se puede observar en el esquema mostrado por Borrór, es más larga que la de U. marina, lo cual ocurre también como una diferencia entre los morfotipos 1 y 3, quedando esta policinetia mucho más cerca de M1.

Este autor indica también que la membrana ondulante en este ciliado, observación que probablemente realizó en vivo, no presenta movimiento coordinado y es más amplia que en el caso de U. marina. Como se ha observado en el presente trabajo, no sólo los cilios de la haplocinetia son más largos en el clon P. acutum, además la policinetia 1 que es ciliada y la 2 presentan cilios mucho más largos que los observados para el morfotipo 1, lo cual es claramente visible en las células en vivo. La situación de macro y micronúcleos fue exactamente similar a la observada en el presente trabajo, quedando justo bajo el citostoma.

El comportamiento de este ciliado, descrito en este trabajo, coincide con el observado para P. acutum (morfotipo 3) en el presente estudio. Las células se mueven

muy rápido en trayectoria lineal, rotando alrededor del eje mayor celular al mismo tiempo, raramente se presentan en posición estática. La célula es acuminada con la región anterior celular ligeramente inclinada hacia la región dorsal celular y presenta gran flexibilidad de movimiento.

La segunda publicación de Borrór en 1963 (A.C. Borrór, 1963a), presenta la descripción de la especie Uronema filificum. Esta es la primera vez que se describe dicha especie por medio de la utilización de una impregnación, desde su creación en 1931 por Kahl (Kahl, A., 1931). La técnica utilizada fue la de nitrato de plata o de Chatton-Lwoff. Esta especie no se ha podido identificar con ninguno de los morfotipos estudiados en el presente trabajo.

El trabajo llevado a cabo por Jankowski en 1964 (Jankowski, A.W., 1964) incluye en la descripción del género Uronema dos especies, Uronema marinum y Uronema halophila como nueva combinación de una especie descrita por Kahl como Loxocephalus halophilus (A. Kahl, 1931). La impregnación utilizada en este trabajo fue el método de Klein.

El origen del organismo descrito por Jankowski en este trabajo como U.marinum Dujardin, 1841 no se indica, y el esquema presentado de dicha especie tras su impregnación no incluye detalles suficientes de la situación de las distintas estructuras del área bucal, como la posición de las polícinetias y su situación, como para poder incluirlo en algunos de los morfotipos observados en el presente trabajo. Sin embargo, alguna de las descripciones observadas, hacen pensar que se trate del morfotipo 2 y que además provenga de un medio dulceacuícola. La primera razón que conduce a esta conclusión se refiere a la observación en el esquema de la primera cinetia somática, que parece ser un cinetosoma más corta que la segunda, carácter típicamente observado en las células pertenecientes al

morfotipo 2. La segunda razón se refiere a la posición del macronúcleo, que normalmente queda sobre el peristoma, en la región anterior celular. Otra razón es la forma celular que es típicamente más redondeada, como ocurre en los clones pertenecientes al morfotipo 2. La última razón, que se refiere a la posibilidad de que esta especie fuera de agua dulce, se encuentra en la observación de este autor sobre cultivos muy abundantes, comenzados con una sola célula, esto es clónicos, parecieron observarse estados de conjugación, característica que fue asiduamente observada en el presente estudio exclusivamente en aquellos clones dulceacuícolas pertenecientes al morfotipo 2.

La especie descrita por Jankowski como U. halophila, no indica tampoco la procedencia marina o dulceacuícola de dicho ciliado excepto por el detalle de que era un sapropele. La impregnación con el método de Klein no provee en el esquema, ni en la descripción ningún dato estructural del área bucal, lo cual hace muy difícil identificar esta especie con alguno de los morfotipos estudiados en el presente trabajo, sin embargo, un detalle que hace sospechar de la identidad de dicha especie con una del género Uronema es la presencia explícita de una cinetia meridiana postoral no ciliada y ocupada por el citopigio, lo cual, obviamente, parece indicar que dicha especie no debería estar incluida en dicho género.

El siguiente trabajo publicado sobre el género Uronema es el llevado a cabo por (Czapik, A., 1964) sobre la estomatogénesis de una especie que identifica con Uronema marinum Dujardin, 1841. Este organismo provenía de una muestra de agua dulce concretamente de aguas residuales y Czapik basándose en la detallada descripción llevada a cabo por Párduzc (B. Párduzc, 1939) sobre U. marinum la identifica con ella. Aunque la descripción morfológica de ejemplares impregnados no es muy detallada, es como indica el propio autor esencialmente similar a la descrita por

Párducz. La observación de las laminas fotográficas, dejan concluir que, efectivamente, dicha especie coincide con la descrita por Párducz y asimismo con las observaciones sobre los clones pertenecientes al morfotipo 2 llevadas a cabo en el presente trabajo. Las razones son las mismas expuestas anteriormente para la identificación de la especie descrita por Párducz.

La redesccripción llevada a cabo por Thompson en 1964 (Thompson, J.C., 1964) sobre U.marinum, es la segunda descripción llevada sobre ciliados pertenecientes a este género de origen marino, tras la utilización de una impregnación, que en este caso fue la de Chatton-Lwoff. Parece ser la primera vez que se depositan, en una colección internacional, las preparaciones de una impregnación sobre un ciliado perteneciente a este género que se designan como holotipo y paratipos de esta especie. Por lo tanto, dicha descripción tiene más valor que todas las presentadas anteriormente.

La descripción llevada a cabo por Thompson, es muy detallada, ya que provee datos de medidas entre policinetias y su situación con respecto a ambos polos celulares, detalles muy importantes, ya que estos datos biométricos se pueden comparar con los obtenidos sobre los clones descritos aquí. Sin embargo, la utilización como en los otros casos de la impregnación de Chatton-Lwoff o de nitrato de plata previene la observación en las estructuras bucales de observaciones detalladas sobre su composición cinetosómica.

La especie descrita por este autor coincide claramente con la del morfotipo 1 descrito en el presente trabajo y queda más cercana dentro de este morfotipo de los clones Ta y Cil7. Esta conclusión se alcanzó principalmente por la comparación, como ya se ha indicado, de las medidas descritas por dicho autor y por la observación de las

fotografías presentadas en las que la situación de las polícinetias con respecto a la última cinetia somática, son claramente las observadas en dicho morfotipo. Resalta la situación de la polícinetia 1 (M1), que queda frente a las posiciones cinetosómicas segunda, tercera y cuarta de la última cinetia somática y la situación anterior de la última cinetia con respecto al resto de las cinetias somáticas, carácter que es indicado por dicho autor en la descripción. El polo posterior, observado en una de las fotografías presentadas en dicho trabajo, parece ser más similar al observado en los clones Ta o Cil7, así como la situación del área bucal completa, más desplazada hacia el área anterior celular.

Este ciliado es claramente diferente de los descritos anteriormente como U.marinum de Parducz (B. Párducz, 1939) o Czapik (A. Czapik, 1964), que como ya hemos indicado coinciden con el morfotipo 2 descrito en el presente trabajo, sin embargo parece acercarse claramente a las descripciones llevadas a cabo por Borrór sobre U.marinum (A.C. Borrór, 1963b), conclusión a la que parece ser que Thompson llegó, asimismo, al estudiar las preparaciones de Borrór. En efecto, este trabajo puede considerarse como el primer paso en la precisa delimitación de la base taxonómica de este género y especie, no sólo por el deposito de preparaciones de esta especie como holotipos y paratipos en una colección internacional¹, sino asimismo por la detallada descripción llevada a cabo. La presencia anterior de otras descripciones diferentes de éstas, y las posteriores a esta que carecieron de la visión comparativa, parecen haber incluido descripciones de distintos morfotipos bajo el mismo nombre.

Borrór vuelve a hacer una recopilación de observaciones de ciliados marinos en 1965 (Borrór, A.C.,

¹ International Collection for Ciliate Type Specimens (Museum of Natural History of the University of Illinois)

1965), describiendo esta vez de una manera más detallada un ciliado que identifica de nuevo con U. acutum von Buddenbrock, 1920, como hiciera, asimismo, en otro trabajo anterior (A.C. Borrór, 1963b). En este trabajo expone detalles de dicho organismo que no había incluido en el trabajo anterior, como el mismo especifica. Este ciliado coincide claramente de nuevo con nuestro clon perteneciente al morfotipo 3, en este caso incluso el número de cinetias es el mismo. La composición de la policinetia M1 no coincide con la observada en el morfotipo 3, pero la utilización de la impregnación de Chatton-Lwoff, probablemente no le permitió la observación clara de dicha policinetia. Sin embargo, sí observó el cinetosoma sencillo que se sitúa típicamente en la parte anterior de dicha policinetia y el tamaño observado (3 μm) es bastante cercano al obtenido en el presente trabajo (2.7 μm).

La indicación de que la policinetia M2 es rectangular e irregular y la observación del esquema presentado por el autor, no dejan lugar a dudas de la identidad morfológica de esta estructura con la estudiada en el clon de Parauronema acutum en el presente trabajo. La separación de esta policinetia con la policinetia 1 (M1) es asimismo, muy similar a la observada en el presente trabajo y es mucho menor que la observada para los otros morfotipos. El tamaño de M3 es también similar al observado para el morfotipo 3 en el presente trabajo. El comportamiento descrito por Borrór para dicha especie es similar al observado en el clon P. acutum o el morfotipo 3.

Thompson en 1967 (Thompson, J.C., 1967) describe el nuevo género Parauronema y como especie tipo a Parauronema virginianum. La descripción se basa en dos organismos marinos aislados independientemente en las costas de Virginia. La comparación de las descripciones biométricas de este autor con las obtenidas en este trabajo, identifican dichos ciliados con el clon del morfotipo 3

(Parauronema acutum), y por lo tanto con las descripciones realizadas por Borrór de U. acutum.

Aunque Thompson reconoce que sus descripciones y la observación de las preparaciones y descripciones de Borrór se refieren al mismo organismo, este autor no se identifica con la opinión de que dicho ciliado representa la especie descrita originalmente por Buddenbrock (Buddenbrock, W.v., 1920), por esta razón prosigue con la creación de ésta como una nueva especie. Sin embargo, posteriores trabajos han considerado estas descripciones idénticas y por lo tanto considerado el nuevo género como auténtico. Reconociendo que U. acutum no conforma las características del género Uronema, debería incluirse en el nuevo género y por tanto la nueva especie debería ser denominada Parauronema acutum como nueva combinación, siendo por lo tanto P. virginianum y U. acutum sinonimias de aquélla. Este problema en la nomenclatura no ha sido nunca resuelto, ya que estas especificaciones no han sido publicadas, dando lugar a situaciones en las que diversos autores no se han dado cuenta de la identidad morfológica de U. acutum con P. virginianum y P. acutum citándose como especies independientes (Dragesco, J. y Dragesco-Kerneis, A., 1986; Puytorac, P. y col., 1987), cuando en realidad ambas corresponden a P. acutum (comunicación personal del Dr. Borrór).

Las primeras descripciones de U. elegans tras la utilización de una impregnación aparecen en 1968, con los trabajos de Thompson y Kaneshiro (Thompson, J.C. y Kaneshiro, E.S., 1968) e independientemente Czapik (Czapik, A., 1968).

El trabajo de Thompson y Kaneshiro, presenta la descripción de una especie, de bastante similitud con el clon Cil3 estudiado aquí, perteneciente al morfotipo 4. Sin embargo, el clon Cil3 parece ser ligeramente más pequeño

que el presentado en dicho trabajo. Asimismo el número de meridianos es menor, aunque los conteos llevados a cabo sobre Cil3, al principio cuando fue aislado se corresponden más o menos con los expuestos en U. elegans. Otras diferencias encontradas, fueron la posición de la policinética 1 con respecto al polo anterior celular, que es mayor en el caso de la especie de U. elegans estudiada por Thompson y Kaneshiro, sin embargo, el tamaño de ésta y de las otras policinéticas, así como la forma y posiciones, parecen ser muy similares a las del clon Cil3. Los polos anterior y posterior presentan el mismo aspecto que el observado en el clon Cil3. Se pueden observar incluso la impregnación de otras estructuras, así como a lo largo de meridianos contiguos, asociadas por dichos autores a los poros de tricocistos, aunque estamos más inclinados a pensar que se trate como en el caso de Cil3 de mucocistos, que como se observó en el estudio de microscopía electrónica aparecen a lo largo de las cinéticas, paralelos a ellas. Otras características no descritas por los autores, pero observadas en las fotografías presentadas, son que la primera y segunda cinéticas que son más cortas posteriormente que el resto de las cinéticas somáticas y que las cinéticas posteriormente, parecen terminar irregularmente, características ambas observadas en Cil3. Así esencialmente esta descripción de U. elegans se acerca a la observada en el clon estudiado aquí de Cil3, aunque U. elegans es mayor que éste.

Este trabajo de Thompson y Kaneshiro incluye también otra redesccripción de U. filificum que tras la de Borrór (A.C. Borrór, 1963a) es la segunda descripción de dicha especie en la que se utiliza una impregnación (técnica de Chatton-Lwoff). La descripción, además de ser mucho más detallada, provee fotografías de dicho organismo tras la impregnación, lo cual es de gran ayuda a la hora de realizar comparaciones objetivamente. Sin embargo, parece no haber ninguna duda en la identidad de esta especie con

la que Borrer describe anteriormente. El tamaño presentado, entra dentro de los mismos límites en ambas especies. El número de cinetias meridianas, coincide mayoritariamente en 17, y el resto de los caracteres, incluso el comportamiento ya descrito por Kahl, en la primera descripción es observado en ésta, al anclarse estos ciliados por el cilio caudal y rotar sobre si mismos.

Esta especie no coincide exactamente con ninguno de los morfotipos estudiados en el presente trabajo, pero los datos expuestos en cuanto a estructuras bucales en dicho trabajo se acercan más a los observados en el morfotipo 5. Otros caracteres como el número de cinetias o posición de la policinetia 1 (M1) con respecto a la última cinetia somática, o la forma celular, no parecen coincidir con los expuestos en dicho trabajo.

El segundo trabajo sobre U. elegans que debió aparecer prácticamente a la vez que el trabajo de Thompson y Kaneshiro, y que es la segunda redesccripción de dicha especie tras la utilización de una impregnación, es el de Czapik (A. Czapik, 1968). Esta especie es ligeramente distinta a la descrita por Thompson y Kaneshiro, siendo en este caso regularmente ovoide, a diferencia de la descrita anteriormente que era más alargada, midiendo 40 μm de longitud. Aunque en la descripción de dicha especie no aparece ningún conteo del número de cinetosomas en las policinetias, el esquema mostrado presenta claramente una policinetia 1 muy anterior portando 5 cinetosomas, así como una policinetia 2 constituida únicamente por dos líneas de 4 cinetosomas y una policinetia 3 muy pequeña de 4 cinetosomas. Probablemente dichas observaciones no sean realmente fiables, ya que la impregnación utilizada, como se puede observar claramente en las fotografías mostradas, raramente permiten el conteo de cinetosomas, sin embargo, su disposición y forma parecen similares a las descritas por Thompson y Kaneshiro para U. elegans, o Cil3 en el

presente trabajo, por medio de la utilización de la impregnación con nitrato de plata.

La fotografías muestran una célula con un casquete anterior libre de cilios, delimitado por 21 a 22 cinetias, mucho más amplio que cualquiera de las otras especies descritas hasta ahora, incluso que en la descripción de Thompson y Kaneshiro en U. elegans. El espacio entre la primera y última cinetias, donde quedan situadas las estructuras bucales, es menos estrecho y la primera policinetia queda más alejada del resto de las estructuras bucales que en la especie descrita como U. elegans por Thompson y Kaneshiro o que en el clon del morfotipo 4, Cil3. La policinetia 1 sin embargo, si comparamos con las observaciones que hemos realizado en algunos de los clones estudiados en el presente trabajo, llevando a cabo más de una impregnación, probablemente no presente más de 4 cinetosomas en una línea, característica que al ser las células tan grandes, la hacen parecer muy pequeña. La situación de esta policinetia es mucho más anterior que la observada en la especie U. elegans por Thompson y Kaneshiro o la observada en el presente trabajo en el clon Cil3.

A pesar de todas estas diferencias, esta descripción se sigue acercado más a la del morfotipo 4, sin embargo se ha de reconocer, que la especie estudiada por Czapik, parece mucho más ovoide que la estudiada aquí (Cil3), lo que induce a pensar que probablemente se trate de células en fase exponencial. El número de cinetias coincidió con las observadas al principio del aislamiento en el clon Cil3, las cuales tras el mantenimiento en cultivo parecieron estabilizarse en 18.

Czapik incluye en este trabajo como nueva especie a U. parva, esta especie no permanecerá por mucho tiempo en el género, ya que las características de situación y composición de las policinetias y haplocinetia bucales, la

situaran posteriormente en otro género completamente distinto (= *Uropedaliu pyriforme* Kahl, 1928). *U. marinum* Dujardin es esquematizada en este trabajo, aunque Czapik no indica nada sobre dicha especie. Esta parece haber sido observada por dicho autor, sin embargo es esencialmente distinta de la que fue descrita en su trabajo anterior en el estudio de la estomatogénesis de *U. marinum*, ya que en este caso parece acercarse más al morfotipo 1.

La primera redescrición de la especie *U. nigricans* por medio de la utilización de una impregnación, aparece con el trabajo publicado en 1968 por Thompson y Evans (Thompson, J.C. y Evans, F.R., 1968). Esta redescrición está basada en el estudio de cuatro estirpes de agua dulce de distintas procedencias.

El estudio llevado a cabo con estas estirpes indica que fueron estudiadas, por medio tanto de la impregnación de Chatton-Lwoff, como protargol, sin embargo, únicamente una de las descripciones presenta un dato sobre la utilización de protargol, en lo referente al tamaño del macronúcleo. El resto de las descripciones están basadas únicamente en la utilización de la técnica de Chatton-Lwoff, y las únicas fotografías mostradas, son las procedentes de esta impregnación.

Dado el tipo de impregnación utilizado -la impregnación con nitrato de plata- la observación y conteo de cinetosomas individuales en las estructuras bucales e incluso cinetias, fue obviamente imposible. Los datos de tamaños de las policinetias bucales y sus situaciones respectivas, así como la ciliación somática, identifican dichos organismos con el morfotipo 2 (clones marinos AD1, AE22 y clones de agua dulce SRBM y SCut 2.1).

Los caracteres más típicos son, en este caso, detalles que los propios autores indican en la descripción y que se

pueden observar en las fotografías presentadas. Por ejemplo se indica que el último cinetosoma de la primera cinetia somática queda muy cerca del final del citopigio, debido a que esta cinetia es más corta que el resto de las cinetias somáticas, carácter que fue observado en todos los clones del morfotipo 2. Otro carácter que se destaca por estos autores, es la posición más anterior de la policineta 1 (M1), quedando situada justo al final del extremo anterior de la última cinetia somática, de la que queda mas cerca, también típico en el morfotipo 2. La típica forma de dicha policineta como en forma de llave ({}), con un cinetosoma central desviado a la derecha del resto, no fue observada en estos casos, pero hay que tener en cuenta que con la impregnación de Chatton-Lwoff, es muy difícil observar esta característica, que es sin embargo visible con carbonato de plata.

El macronúcleo y micronúcleo, como es indicado, tiende a estar más desviado anteriormente, lo cual también ocurre típicamente en el morfotipo 2.

Los datos biométricos expuestos, para cada uno de los cuatro ciliados estudiados en este trabajo, coinciden en los rangos estudiados para los ciliados pertenecientes al morfotipo 2 en el presente trabajo. Es destacable como diferencia con el resto, la distancia entre el polo anterior celular y la policineta 1, que es típicamente menor que la observada para aquellos clones del morfotipo 1.

Como se ha observado en el presente trabajo en el morfotipo 2 y asimismo por Thompson y Evans en U. nigricans, este tiende a ser más pequeño que el morfotipo 1 o que U. marinum, y presenta un casquete anterior más acentuado. Los otros caracteres definitorios utilizados por dichos autores, como los tamaños de las policinetas 1 (M1) y 2 (M2) o el número de cinetias somáticas, son caracteres

menos definitorios como se puede observar por la comparación de los morfotipos estudiados en el presente trabajo.

Otra descripción de una nueva especie en Uronema aparece en 1968, con el nombre de U. pelagica (Stein, B.H. y Hamilton, R.D., 1969). La descripción de esta especie coincide claramente con la del morfotipo 1. Estos autores se basan, para la creación de la nueva especie, en caracteres como un número menor de cinetias que en U. marinum, una célula más alargada, mayor separación entre las policinetias M2 y M3 y una mayor policinetia M3. Sin embargo, los rangos encontrados en el morfotipo 1, incluyen todas estas variaciones, por lo tanto esta descripción se considerará dentro de dicho morfotipo. Hay que destacar que como se ha observado en muchos de los clones estudiados aquí, no se observó ningún micronúcleo en este ciliado, y se puede observar que la última cinetia termina al mismo nivel que el resto de las cinetias somáticas, como ocurrió únicamente en los clones Ta y Cil7 incluidos en el morfotipo 1.

El trabajo llevado a cabo por Foissner en 1971 (Foissner, W., 1971), con la creación de una nueva especie en el género Uronema, la especie U. parduczi de origen dulceacuícola. Esta nueva descripción se basó en la observación del sistema de líneas argentófilas, por medio de la utilización del método de Klein, lo cual parece un poco subjetivo, ya que realmente la única descripción con la que pudo comparar su trabajo fue la de Parducz en 1939 (B. Párducz, 1939). Parducz fue el único autor que utilizó dicha impregnación en la descripción de una especie dentro del género Uronema. Sin embargo, Foissner hace notar que la especie descrita por Parducz, no coincidía con la descripción establecida para U. marinum por (J.C. Thompson, 1964), por lo cual considera esta una nueva especie que denomina en honor al autor que la describió por primera vez

por medio de una impregnación. La utilización de la técnica de Chatton-Lwoff, puede impregnar ligeramente el sistema de líneas argentófilas, pero no tanto como la técnica de Klein, lo cual no sólo se ha podido comprobar en el presente trabajo, sino además en todos los trabajos llevados a cabo con dicha técnica, esto hace difícil la comparación de dichos trabajos con el resto. Sin embargo, únicamente la observación de la posición de las estructuras bucales tan típicas es suficiente para localizar estas descripciones en el morfotipo 2.

La creación de esta nueva especie, como el mismo Foissner indica, se basa además de en el ya indicado sistema argentófilo, en el número de cinetias somáticas. Este carácter y la observación de las impregnaciones de las que aparecen varias fotografías, parecen indicar claramente que dicha especie es la misma descrita por Parducz y, asimismo, coincide con la morfología mostrada por los clones pertenecientes al morfotipo 2. Los caracteres típicos del morfotipo 2, como la situación de la policinetia 1 (M1) muy cerca de la última cinetia somática justo frente a la primera y segunda posiciones cinetosómicas y su forma que en este caso se puede observar en las fotografías (aunque no en el esquema presentado por el autor). Asimismo, la primera cinetia somática es más corta que el resto de las cinetias somáticas. Otros caracteres como el número de cinetias, entran también dentro de los rangos encontrados para dicho morfotipo.

Este trabajo no produce datos como los mostrados anteriormente en la redescrípción de U. marinum (J.C. Thompson, 1964) o de U. nigricans (J.C. Thompson y F.R. Evans, 1968), en cuanto a situaciones respectivas entre policinetias en el área bucal o con respecto a ambos polos celulares, aunque no es sorprendente ya que la técnica utilizada -Klein- deforma más las células que la impregnación de Chatton-Lwoff, utilizada por los otros

autores y probablemente los datos no serían comparables.

La discusión en este trabajo incluye un comentario del autor en el que considera que el nuevo género creado por Thompson como Parauronema (J.C. Thompson, 1967), no tiene ningún sentido y que se debería considerarse la especie tipo (P. virginianum) como un miembro más del género Uronema. Esta conclusión, en vista de las diferencias observadas, en otros trabajos y el presente, entre Parauronema y Uronema, no parecen presentar ninguna justificación, ya que ambos géneros son lo suficientemente distintos, no sólo en lo referente a caracteres de la infraciliación bucal, como se ha podido observar en los resultados, sino asimismo en cuanto al comportamiento observado en ambos géneros.

En un trabajo sobre ciliados de la península Antártica (Thompson, J.C., 1972) describe un organismo como U. marinum, basado en el estudio de varios cultivos aislados. Thompson identifica estos con U. marinum (J.C. Thompson, 1964), sin embargo todos los datos, de tamaño y número de cinetias de dichos ciliados, son mucho mayores que cualquiera de los descritos en U. marinum. Thompson indica que sería aconsejable considerar todas estas formas como miembros del complejo U. marinum, como se había estado haciendo con los complejos existentes para algunas de las especies de Paramecium o Tetrahymena. La morfología del área bucal y su situación en la célula incluyen a este ciliado en el morfotipo 1, aunque estos ciliados tienden a presentar un número mayor de cinetias que los observados en el presente trabajo, los tamaños pueden entrar dentro de los rangos observados en algunos de los clones mayores de dicho morfotipo.

El trabajo llevado a cabo por Agamaliyev en 1974 sobre muestras recogidas de superficies sumergidas en el Mar Caspio (Agamaliyev, F.G., 1974), describe dos especies

pertenecientes al género Uronema, U. marinum y U. elegans, siendo esta última la primera cita en dicha área.

Los caracteres descritos para la especie U. marinum son sorprendentes, en cuanto que esta estirpe es mucho mayor que ninguna de las descripciones anteriores. Asimismo el número de cinetias es mucho mayor que cualquiera que los descritos hasta entonces. La posición de las estructuras bucales con respecto a la última cinetia somática incluyen esta descripción dentro del morfotipo 1. La observación en el esquema de lo que parece ser una primera cinetia somática más corta que el resto de las cinetias somáticas, hace dudar. Sin embargo un carácter llamativo en el esquema es la forma de la policinetia 1 (M1) en cuyo polo posterior parecen situarse dos cinetosomas. Esta característica ha sido observada, asimismo, en alguno de los clones estudiados en el presente trabajo y que han sido incluidos en el morfotipo 1 (Ta o Cil7).

La segunda especie encontrada por Agamaliyev, fue U. elegans, citada por primera vez, como el mismo autor indica en el Mar Caspio. Esta descripción presenta un diagrama de una célula típicamente redondeada cuyo tamaño es mayor que el de las especies descritas en otros trabajos (A. Czapik, 1968; J.C. Thompson y E.S. Kaneshiro, 1968). La morfología del área bucal es la típica observada para U. elegans en otros casos y en nuestro caso en el morfotipo 4.

El trabajo llevado a cabo por de Puytorac y col. (1974), aunque no exactamente dedicado al estudio del género Uronema, incluye muchas de las especies de éste y sus procesos estomatogenéticos como punto de comparación con otro escuticociliado. Los esquemas mostrados de U. marinum y U. nigricans, no producen una diferenciación clara entre ambas especies, sin embargo un cuadro comparativo entre diferentes especies del género Uronema, muestra los principales caracteres distintivos entre las

especies, siendo consideradas de forma importante la distancia entre el polo anterior celular y la parte anterior de la M1, que como se ha observado es uno de los caracteres que permiten la distinción de diferentes morfotipos en el presente trabajo. Se ha de destacar la puntualización llevada a cabo por dichos autores sobre la identidad entre U. acutum (A.C. Borrór, 1963b) y Parauronema virginianum (J.C. Thompson, 1967), así como entre U. parva (A. Czapik, 1968) y Uropetalium pyriforme Kahl, 1928, que no había sido indicada en ningún trabajo anterior.

En 1976 aparece un trabajo sobre el estudio en microscopía electrónica de transmisión sobre una estirpe descrita como P. virginianum por (Rodrigues de Santa Rosa, M. y Puytorac, P. de, 1976). Este ciliado es identificado con una de las estirpes descrita por Thompson (J.C. Thompson, 1967), en la primera descripción del género. La descripción clásica en este trabajo está basada en la impregnación de protargol, la cual, como se puede observar por las fotografías mostradas en dicho trabajo, no da lugar a muchos detalles y de hecho, como se ha observado en el presente trabajo, no se pueden observar cinetosomas individuales en la infraciliación ni somática ni bucal. La descripción por medio de microscopía óptica no es muy detallada, sólo se describe la infraciliación bucal como una polycinética M1 con dos líneas de 5 a 6 cinetosomas, una polycinética M2 masiva y una M3 muy pequeña. Sin embargo, esta especie debe ser incluida en el morfotipo 3, y se corresponde en realidad con P. acutum.

El trabajo llevado a cabo por Agamaliev en 1978 en aguas del Mar Caspio (Agamaliev, F.G., 1978) describe por primera vez, por medio de impregnación, una especie perteneciente a U. nigricans procedente de un medio marino. La descripción enfatiza ciertos caracteres, que se han descrito en el presente trabajo en los clones

pertenecientes al morfotipo 2, como son la posición más anterior de la polícinetia 1 (M1). En este caso no sólo la primera, sino también la segunda cinetia somática, son más cortas posteriormente que el resto.

La especie Uronema filificum es trasladada a otro género por Jankowski (Jankowski, A.W., 1980), en un trabajo en el que reorganiza la clasificación de ciliados. El nuevo género fue denominado Uronemita. Las razones para la creación de este nuevo género, no son explicadas en dicho trabajo, aunque se supone que es probablemente de todas las especies incluidas en el género Uronema, una de las más diferentes, y esta fue considerada una razón suficiente, ya que no se han llevado a cabo ningún otro tipo de trabajos en los que se haya estudiado la secuencia estomatogenética en esta especie. Este trabajo escrito en ruso, ha sido poco conocido, lo que dio lugar probablemente a la posterior inclusión de esta especie por Small y Lynn (Small, E.B. y Lynn, H.D., 1985) en otro nuevo género Urocyclon, aunque aquí de nuevo no se explican las razones por las que se traslada este ciliado al nuevo género, en el que se incluye otro ciliado cuyos caracteres son más diferentes de U. filificum que las diferencias entre esta y el resto de las especies de Uronema.

El trabajo llevado a cabo por Cheung y col. en 1980, describe una ciliado que causo infecciones sobre algunos peces en el acuario de Nueva York. Estos autores consideran dicho ciliado como parásito, alimentándose de células sanguíneas y causando daño extensivo en la musculatura del hospedador, causando al final su muerte. Sin embargo los intentos, tras el aislamiento de dicho ciliado, de provocar una reinfección de un hospedador por dicho ciliado, no fueron positivos, por lo que fue considerado más propiamente un patógeno facultativo u oportunista. La especie de origen marino, que fue identificada como perteneciente al complejo de especies de U.marinum, es

descrita por medio de la impregnación de Chatton-Lwoff. Los datos expuestos en el trabajo tanto de estructuras bucales, como somáticas, identifican este ciliado con los clones pertenecientes al morfotipo 2 más que al 1. Se indica que el último meridiano somático comienza anteriormente justo frente a la policinetia M1, característica típica del morfotipo 2. Asimismo, la distancia de esta policinetia (M1) al polo anterior es más corta ($3\text{ }\mu\text{m}$) como ocurre en el morfotipo 2.

El estudio de una especie de agua dulce descrita como perteneciente a la especie U. marinum por Téllez (Téllez, C., 1980) es el primer estudio llevado a cabo sobre este género por medio de la impregnación con carbonato de plata amoniacoal (Fernández-Galiano, D., 1976). Dicho estudio es uno de los más detallados sobre la infraciliación tanto somática como bucal, ya que a diferencia de la impregnación mayoritariamente utilizada en el estudio de este género (técnica de Chatton-Lwoff), esta técnica permite la observación detallada de la composición cinetosómica de las policinetias y haplocinetia en el área bucal. Sin embargo este trabajo no llevó a cabo medidas sobre las estructuras bucales, como se habían llevado hasta entonces, con las otras técnicas. La observación de las fotografías y el estudio de la descripción de esta especie sin embargo, nos permiten concluir su pertenencia al morfotipo 2 estudiado en el presente trabajo.

La principales razones que nos han llevado a esta conclusión son en primer lugar la composición y situación de la policinetia 1 (M1), que queda, como en todos los clones del morfotipo 2, muy anterior, justo en frente de las dos primeras posiciones cinetosómicas de la última cinetia somática y muy cerca de ella. Su composición cinetosómica en una línea, y la típica desviación de uno de los cinetosomas centrales hacia la derecha tomando el aspecto de llave (}), es la típica en el morfotipo 2.

La primera cinetia somática, se observó en las fotografías, que era ligeramente más corta posteriormente que el resto de las cinetias somáticas, como en el morfotipo 2. El macronúcleo fue el típicamente observado en los clones del morfotipo 2 de agua dulce.

Todos estos caracteres coinciden con los observados en las especies descritas como U. marinum por (A. Czapik, 1964; A.W. Jankowski, 1964; B. Párduzc, 1939), U. nigricans por (J.C. Thompson y F.R. Evans, 1968) o U. parduczi por (W. Foissner, 1971).

El trabajo llevado a cabo por (Wilbert, N. y Kahan, D., 1981) en un lago salado cerca del Mar Rojo, describe tres especies que han sido consideradas en el presente trabajo, Parauronema virginianum, Uronema filificum y Uronema nigricans. Este es el segundo trabajo utilizando alguna técnica de impregnación, que describe una especie procedente de un medio marino como U. nigricans.

La especie descrita en este trabajo como Parauronema virginianum, corresponde en realidad a Parauronema acutum por las razones expuestas anteriormente y que obviamente dichos autores desconocían. Los caracteres de esta se corresponden con el clon estudiado aquí del morfotipo 3.

La segunda especie descrita en este trabajo como U. nigricans, parece acercarse al morfotipo 2 en cuanto a las medidas obtenidas por dichos autores tras la impregnación de Chatton-Lwoff. Sin embargo el esquema presentado por dichos autores, en cuanto a composición de las policinetias 2 (M2) y 3 (M3), no es el observado en dichos morfotipos, ni parece que tampoco en las publicaciones anteriores sobre esta especie. La posición de la policinetia 1 asimismo queda entre la segunda y tercera posiciones cinetosómicas de la última cinetia somática, lo cual no ocurre en los clones del morfotipo 2 estudiados aquí.

La última especie estudiada en este trabajo perteneciente al género Uronema es U. filificum. Esta especie coincide ciertamente con las descripciones llevadas a cabo anteriormente por otros autores sobre esta especie, en cuanto a la forma celular, el alto número de cinetias y el típico comportamiento de esta especie capaz de anclarse por medio del cilio caudal (A.C. Borrór, 1963a; J.C. Thompson y E.S. Kaneshiro, 1968). Lo más sorprendente en los esquemas mostrados por estos autores, es la composición de la policinetia 1 de una línea de 6 cinetosomas, que no había sido observada en la redescrípción con la impregnación de Chatton-Lwoff por (J.C. Thompson y E.S. Kaneshiro, 1968). El esquema mostrado muestra unas policinetias 2 (M2) y 3 (M3) que se parecen más a las observadas en el morfotipo 5 (clon SW11). La forma celular sin embargo, como ocurrió en la observada por Thompson y col. (J.C. Thompson y E.S. Kaneshiro, 1968), no parece corresponderse con la de este morfotipo, en el que tampoco se ha observado el comportamiento observado en ambos trabajos, en que dicho ciliado se ancla por el cilio caudal y rota sobre si mismo, comportamiento descrito, asimismo, por Kahl en la primera descripción del ciliado (A. Kahl, 1931).

La especie descrita como U. castellonensis (Fernández-Leborans, G. y M.C. Zaldumbide, 1984) de origen marino, es la primera especie marina perteneciente al género Uronema descrita por medio de la impregnación con carbonato de plata amoniacoal (D. Fernández-Galiano, 1976). Esta presenta los caracteres típicos de los clones pertenecientes al morfotipo 1.

La observación de la fotografía mostrada en dicho trabajo se corresponde con la apariencia de una célula en fase exponencial de crecimiento y los valores de las posiciones y tamaños de las estructuras bucales, quedan dentro de los valores observados para los clones

pertenecientes al morfotipo 1. Aunque es difícil la observación clara de la situación de la polícinetia 1 (M1) con respecto a la última cinetia somática, ésta parece estar situada más abajo de la primera posición cinetosómica de la última cinetia somática, lo cual es típico de los clones pertenecientes al morfotipo 1. El tamaño del macronúcleo fue similar al observado para los clones del morfotipo 1 con la misma impregnación.

Las últimas descripciones llevadas a cabo sobre especies de agua dulce se refieren a las llevadas a cabo en el lago Tanganyika por Dragesco y Dragesco-Kernéis (Dragesco, J. y Dragesco-Kerneis, A., 1991). Estas observaciones fueron llevadas a cabo sobre ciliados tras la impregnación con nitrato de plata o técnica de Chatton-Lwoff. La observación de estos datos, así como los esquemas presentados sobre estos ciliados, identificados por dichos autores como U. nigricans, identifican estos con el morfotipo 2. Los datos indicados por estos autores incluyen longitud y anchura celulares, tamaño del área bucal completa, distancia entre el polo anterior y la parte anterior de la polícinetia 1 (M1) y número de cinetias, datos todos que entran dentro de los rangos observados para los clones del morfotipo 2 tras la impregnación con nitrato de plata.

Otros datos indicados, como el número de cinetosomas por cinetia, también se encuentran dentro de los rangos encontrados en dicho morfotipo. Sin embargo estos autores indican claramente que estos ciliados presentan todas las cinetias completas portando dobles cinetosomas, lo cual no es normal en este morfotipo. De hecho la observación de algunas de las impregnaciones, sobre los clones del morfotipo 2 de agua dulce con carbonato de plata amoniacoal, parecían indicar que las cinetias portaban cinetosomas dobles, sin embargo el estudio por medio de microscopía electrónica en uno de los clones (SRBM)

demostró que las cinetias como en el resto de los clones no eran dobles completas, sino que la parte anterior porta cinetosomas dobles, mientras que la posterior presenta cinetosomas sencillos, como ocurre en el resto de los clones.

Algunos de los últimos trabajos que incluyen recopilaciones de descripción tanto del género Uronema como de algunas de las especies incluidas en él, han sido los trabajos de (E.B. Small y H.D. Lynn, 1985) y de (J. Dragesco y A. Dragesco-Kerneis, 1986).

El trabajo de Small y Lynn, presenta la descripción de la familia Uronematidae, considerando que los géneros incluidos en esta, presentan el vestigio del escutico ciliado, lo cual como hemos podido comprobar en el presente trabajo, no es así, por lo menos en el género Uronema. La definición del género Uronema es modificada ligeramente, de tal manera que así produce una nueva combinación de una de las especies anteriormente incluidas en el género - Uronema filificum- en el nuevo Urocyclon. La definición del género Urocyclon, sin embargo, no encaja con las descripciones anteriores de Uronema filificum, ya que los caracteres morfológicos en lo que se refiere a la policineta M1 o ciliación somática, no deberían incluir esta especie con la otra nueva especie Urocyclon chesapeakeensis incluida en dicho género, tal y como queda definido.

El trabajo de Dragesco (Dragesco J.A. y Dragesco-Kerneis, 1986) incluye una de las mejores recopilaciones del género Uronema. Este trabajo agrupa todas las descripciones realizadas por medio de la utilización de impregnaciones en el género Uronema desde Parducz y algunas inéditas de dichos autores. Sin embargo, esta recopilación sigue considerando U. acutum dentro del género Uronema, la cual definitivamente debe estar incluida

en el género Parauronema, ya que como los autores americanos indican (E.B. Small y H.D. Lynn, 1985), dicha especie no conforma los caracteres descritos en el género Uronema (Dr.Lynn com.pers.). Además incluyen, otras figuras inéditas que no parecen pertenecer al morfotipo de U. acutum (página 344, Lámina 90 d y e), ni por la infraciliación bucal, ya que la policientia 1 (M1) presenta una única línea, ni por la estructura del vestigio del escutico, que es típicamente como la encontrada en el morfotipo 1.

Los últimos trabajos llevados a cabo con alguna especie del género Uronema pertenecen a O.Coppellotti (Coppellotti, O., 1990) sobre una especie identificada con U. marinum del Antártico y Song (Song, W.B., 1991) sobre U. nigricans.

El trabajo (O. Coppellotti, 1990) describe una especie de origen marino, aislada en una muestra procedente del Antártico. La especie es descrita por medio de la utilización de la impregnación de nitrato de plata y por medio de microscopía electrónica de barrido. Ésta coincide con las características generales descritas para el género Uronema y es identificada con U. marinum, aunque las diferencias anotadas (M2 únicamente dos líneas por ejemplo), se recalcan en el sentido de nuevo de la variabilidad indicada por Thompson en esta especie como típica del complejo de U. marinum. Esta descripción coincide con los caracteres típicos descritos para el morfotipo 1 en el presente trabajo.

El último trabajo llevado a cabo por (W.B. Song, 1991), describe la morfología y los procesos estomatogenéticos de una especie dulceacuícola identificada con U. nigricans. El trabajo, llevado a cabo con la impregnación con nitrato de plata, es lo suficientemente detallado para poder identificar éste ciliado con nuestra

descripción del morfotipo 2.

Especie	Autor	Impregnación	Morfotipo(1)	Origen
<u>U. acutum</u>	Borrer, 1963b	Método de Chatton-Lwoff	3	Marino
"	Borrer, 1965	Método de Chatton-Lwoff	3	Marino
<u>P. acutum</u>	Thompson, 1967	Método de Chatton-Lwoff	3	Marino
<u>P. virginianum</u>	Rodrigues y col, 1976)	Protargol	3	Marino
"	Small y Lynn, 1985	Protargol	3	Marino
<u>U. acutum</u>	Dragesco y Dragesco, 1986	Método de Chatton-Lwoff	3	Marino
<u>P. virginianum</u>	Wilbert y Kahan, 1981	Método de Chatton-Lwoff	3	Marino
<u>U. marinum</u>	Párduez, 1939	Método de Klein	2	Agua dulce
<u>U. marina</u>	Borrer, 1963b	Método de Chatton-Lwoff	1	Marino
<u>U. marinum</u>	Jankowski, 1964	Método de Chatton-Lwoff	2 (?)	Agua dulce(?)
"	Czapik, 1964	Método de Chatton-Lwoff	2	Agua dulce
"	Thompson, 1964	Método de Chatton-Lwoff	1	Marino
"	Czapik, 1968	Método de Chatton-Lwoff	1	(?)
"	Thompson, 1972	Método de Chatton-Lwoff	1	Marino
"	Puytorac, Groliere, 1974	Método de Chatton-Lwoff	1	Marino
"	Téllez, 1980	Método de carbonato de plata	2	Agua dulce
"	Cheung y col. 1980	Método de Chatton-Lwoff	2 (?)	Marino
"	Small y Lynn, 1985	Protargol	1	(?)
"	Dragesco y Dragesco, 1986	-----	1	(?)
"	Coppellotti, 1990	Método de Chatton-Lwoff	1	Marino

Tabla 26.-

Descripciones de U. acutum, P. acutum o U. marinum en la bibliografía.
 (1).- De acuerdo con la clasificación por morfotipos utilizada en el presente trabajo.

Especie	Autor	Impregnación	Morfotipo(1)	Origen
<u>U. elegans</u>				
"	Thompson y Kaneshiro, 1968	Método de Chatton-Lwoff	4	Marino
"	Czapik, 1968	Método de Chatton-Lwoff	4	Marino
"	Agamaliyev, 1974	Método de Chatton-Lwoff	4	Marino
"	Small y Lynn, 1985	Protargol	4	(?)
"	Dragesco y Dragesco, 1986	-----	4	(?)
"	Thompson y Croom, 1978	Método de Chatton-Lwoff	4	Marino(?)
<u>U. filificum</u>				
"	Borror, 1963a	Método de Chatton-Lwoff	-	Marino
"	Thompson y Kaneshiro, 1968	Método de Chatton-Lwoff	5	Marino
"	Wilbert y Kahan, 1981	Método de Chatton-Lwoff	5	Marino
"	Small y Lynn, 1985	Protargol	-	Marino
<u>U. nigricans</u>				
"	Thompson y Evans, 1968	Método de Chatton-Lwoff	2	Agua dulce
"	Puytorac, 1974	Método de Chatton-Lwoff	2	(?)
"	Grolière, 1976)	Método de Chatton-Lwoff	-	(?)
"	Agamaliyev, 1978	Método de Chatton-Lwoff	2	Marino
"	Wilbert y Kahan, 1981	Método de Chatton-Lwoff	-	Marino
"	Dragesco y Dragesco, 1986	-----	-	(?)
"	Dragesco y Dragesco, 1991	Método de Chatton-Lwoff	2	Agua dulce
"	Song, 1991	Método de Chatton-Lwoff	2	Agua dulce

Tabla 27.-

Descripciones de U. elegans, U. filificum y U. nigricans en la bibliografía.
 (1).- De acuerdo con la clasificación por morfotipos utilizada en el presente trabajo.

Especie	Autor	Impregnación	Morfotipo(1)	Origen
<u>U. parduczi</u>	Foissner, 1971 Dragesco y Dragesco, 1986	Klein "	2 "	Agua dulce
<u>U. pelagica</u>	Stein y Hamilton, 1969	Protargol	1	Marino
<u>U. castellonensis</u>	Fernández-Leborans, 1984	Carbonato de Plata	1	Marino
<u>U. muscicola</u>	Téllez, 1980	Carbonato de Plata	-	Agua dulce

Tabla 28.-

Descripciones de U. parduczi, U. pelagica, U. castellonensis y U. muscicola en bibliografía.
(1).- De acuerdo con la clasificación por morfotipos utilizada en el presente trabajo.

El estudio de todas las publicaciones llevadas a cabo sobre el género Uronema con la utilización de alguna técnica de impregnación, nos ha permitido identificar los morfotipos estudiados en el presente trabajo. Al identificar morfotipos, sobre cada uno de los clones, se han podido unificar categorías de caracteres, y utilizar estas para poder delimitar más claramente el concepto de las descripciones, anteriormente incluidas en distintas especies en el género.

El morfotipo número 1, en el que se incluyeron los clones U. marinum, U. schewiakoffi, X2, Ta, AD2, AE21, Cil1, BBCil y Cil7, por medio de las descripciones morfológicas clásicas, se pueden considerar como pertenecientes al complejo de la especie U. marinum, tal y como fue descrita por Thompson (J.C. Thompson, 1964). Esta redesccripción debe ser considerada la de referencia, no sólo por ser una de las primeras más detalladas, en cuanto a la situación de las estructuras bucales en la célula y a las posiciones relativas entre ellas, sino asimismo, por que dicha descripción está basada en preparaciones por medio de una técnica de impregnación, en este caso la de Chatton-Lwoff (una conteniendo el holotipo y otra con paratipos), que fueron depositadas en una colección internacional, características estas muy importantes si tenemos en cuenta que el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (Interbational Code of Zoological Nomenclature, 1985) en el que está basado la nomenclatura de ciliados, establece la importancia de estos tipos, como los portadores de los nombres científicos de todos los taxones animales, estableciéndolos como referencia standard internacional, que provee objetividad en la nomenclatura zoológica (artículos 72-75) .

Se han podido, en algunos casos, delimitar ciertos detalles en nuestras observaciones sobre los clones del morfotipo 1, que permiten diferenciarlos ligeramente e

incluir ciertas descripciones bibliográficas como más o menos cercanas a dichos clones. Así, por ejemplo, la especie descrita por Thompson como U. marinum (J.C. Thompson, 1964), es más fácilmente identificable con uno de los clones incluidos en el morfotipo 1, concretamente con el clon Cil7. La especie descrita por (F.G. Agamaliyev, 1974), asimismo, presenta una polycinetia 1 (M1) característica, que posteriormente presenta dos cinetosomas al mismo nivel, este engrosamiento argentófilo a dicho nivel, ha sido observado únicamente en los clones Cil7 y Ta.

El clon de U. schewiakoffi obtenido de la CCAP pareció desde un principio de adscripción dudosa, ya que dicha especie fue transferida al género Pseuduronema por Hoare en 1927 (Hoare, C.A., 1927), género creado precisamente por dicho autor para la inclusión de las especies descritas por como U. schewiakoffi por (W.v. Buddenbrock, 1920) y U. oval de (Schewiakoff, W., 1893). Los datos obtenidos con esta especie de la CCAP no indican ni el origen (excepto que es marina), ni quién aisló dicho ciliado. Sin embargo, morfológicamente, está incluida en el morfotipo 1 siendo similar a la otra especie obtenida de la colección de cultivo como U. marinum. La principal diferencia entre ambas es el tamaño, ya que U. schewiakoffi es más grande.

Las descripciones llevadas a cabo sobre la especie Uronema marinum por medio de la utilización de impregnaciones de (A.C. Borrór, 1963a; A.C. Borrór, 1965; O. Coppelotti, 1990; A. Czapik, 1964; J. Dragesco y A. Dragesco-Kerneis, 1986; J. Dragesco y Dragesco-Kerneis, 1991; G. Fernández-Leborans y C. Zaldumbide, 1984; Kaneshiro, E. y Holz, G.G.J., 1976; Párducz, B., 1934; J.C. Thompson, 1964) son consideradas como descripciones semejantes al morfotipo 1, como se puede observar en la Tabla 26.

La delimitación morfológica por tanto de estas especies queda, por el trabajo realizado aquí, como ciliación somática entre nueve y catorce cinetias, con catorce a veinte cinetosomas por cinetia (valores medios). Policinetia 1 (M1) no ciliada, con cuatro y cinco cinetosomas, situada frente a la posición cinetosómicas tercera de la última cinetia somática (o segunda y cuarta), lo cual se traduce en una distancia al polo anterior celular entre 4.5 a 5.5 μm (medida en impregnación con nitrato de plata). Policinetia 2 (M2) compuesta siempre por tres líneas de cinetosomas, dos entre 5 y 6 cinetosomas y la tercera suele tener 3 o 4. Distancia entre las policinetias 1 y 2 entre 2 y 3 μm (medida en impregnación con nitrato de plata). Policinetia 3 (M3) compuesta por nueve cinetosomas dispuestos en tres líneas de cuatro, tres y dos cinetosomas respectivamente en posición oblicua respecto a la haplocinetia. Vestigio del escutico no ciliado, con tres estructuras argentófilas dispuestas en los vértices de un triángulo invertido al final del segmento B de la haplocinetia.

El morfotipo 2 perteneciente a los clones marinos AD1 y AE22 y a los de agua dulce SRBM y Scut 2.1, identificado con la descripción de Thompson de U. nigricans (J.C. Thompson y F.R. Evans, 1968), alguna de las descripciones previas a las de Thompson lo identifican con U. marinum. Como se puede observar en la Tabla 26, las descripciones de U. marinum de (B. Párduez, 1939), (A.W. Jankowski, 1964), (A. Czapik, 1964), (W. Foissner, 1971), (C. Téllez, 1980), que se corresponden al morfotipo 2, se han considerado, por lo tanto, descripciones de la especie U. nigricans. Estas observaciones indican, que U. nigricans o el morfotipo 2 parecen encontrarse tanto en medios marinos como dulceacuícolas, mientras que el morfotipo 1, identificado con U. marinum, ha sido descrito únicamente en medios marinos. No se descarta la posibilidad, aunque no se ha podido comprobar en el presente trabajo, de la

existencia en este taxón, como se ha especulado para U. marinum (J.C. Thompson, 1972), de un complejo de especies.

En este morfotipo, se observó en principio la apariencia de dobles cinetosomas a lo largo de toda la cinetia. Esta disposición de pares de cinetosomas sólo ha sido observada y descrita en una publicación de una descripción de Uronema nigricans en el lago Tanganyika (J. Dragesco y A. Dragesco-Kerneis, 1991) y para una especie de agua dulce identificada como Uronema marinum (C. Téllez, 1980). Sin embargo, a pesar de esta apariencia, el estudio por medio de microscopía electrónica de transmisión, parece indicar la presencia, como en los otros morfotipos, de cinetosomas dobles en la parte anterior celular y sencillos en la posterior.

La delimitación morfológica por tanto de estas especies queda como: ciliación somática entre once y trece cinetias, con trece a dieciséis cinetosomas por cinetia (Tabla 25). Policinetia 1 (M1) no ciliada con cinco a seis cinetosomas, con el central ligeramente desviado a la derecha, muy cerca de la última cinetia de la que queda situada frente a las posiciones cinetosómicas primera y segunda, lo cual se traduce en una distancia al polo anterior celular entre 3.0 y 3.5 μm (medida en impregnación con nitrato de plata). Policinetia 2 (M2) compuesta siempre por tres líneas de cinetosomas, dos entre 4 y 5 cinetosomas y la tercera suele tener 2 o 3. Distancia entre las policinetias 1 y 2 entre 1.5 y 2.3 μm (medida en impregnación con nitrato de plata). Policinetia 3 (M3) compuesta por ocho o nueve cinetosomas dispuestos en tres líneas de cuatro, tres y dos o un cinetosomas respectivamente, en posición oblicua respecto a la haplocinetia. Vestigio del escutico no ciliado, y como en el morfotipo 1, con tres estructuras argentófilas dispuestas en los vértices de un triángulo invertido al final del segmento B de la haplocinetia.

El morfotipo 3 perteneciente al clon de Parauronema acutum coincide, en cuanto a caracteres utilizados en la descripción morfológica, con las descripciones llevadas a cabo por (A.C. Borrór, 1963b; A.C. Borrór, 1965) sobre U. acutum, con las de (J.C. Thompson, 1967) sobre P. acutum y (N. Wilbert y D. Kahan, 1981) sobre P. virginianum. La variabilidad morfológica en las descripciones es muy pequeña dejando pocas dudas sobre las identificaciones. La única descripción distinta es la presentada para U. acutum por (E.B. Small y H.D. Lynn, 1985), en la que presenta un dibujo de un ciliado tras impregnación con protargol, que presenta todas las cinetias somáticas con dobles cinetosomas y la policinetia 1 (M1) con dos líneas completas. Esta descripción parece dudosa, ya que como se ha podido comprobar por medio de todas las impregnaciones y microscopía electrónica de transmisión, este ciliado presenta como los clones de Uronema, cinetias que en la parte anterior portan cinetosomas dobles y en la posterior sencillos. La policinetia como se ha descrito en el capítulo de resultados, presenta dos líneas de cuatro cinetosomas y un cinetosoma anterior a ellas. La única posibilidad es que dicho autor haya representado un ciliado en proceso de división, como parece observarse, asimismo, por la composición del vestigio del escutico representado, con siete cinetosomas en línea, cuando dicho ciliado sólo presenta tres en interfase.

Dragesco y Dragesco-Kerneis, 1986 incluyen en su trabajo, además de las recopilación de descripciones de U. acutum, otras inéditas que no parecen pertenecer a este morfotipo (página 344, Lámina 90 d y e). Dicha descripción se corresponde sin embargo con el morfotipo 1. Esta situación demuestra una vez más la confusión sobre este taxón. Como ya se ha indicado anteriormente la especie descrita primeramente por medio de la impregnación de nitrato de plata por (A.C. Borrór, 1963b) e identificada como Uronema acutum von Buddenbrock, 1920, coincidiría con

la posteriormente descrita como P. virginianum por (J.C. Thompson, 1967), por lo tanto P. virginianum sería una sinonimia de U. acutum, sin embargo, dicho ciliado nunca descrito hasta entonces por medio de una impregnación, presentaba características lo suficientemente diferentes, como para ser considerado en un género distinto: Parauronema; por lo tanto ambas descripciones pertenecían a la misma especie, como asimismo reconocieron ambos autores (Dr. Borrer, comun. pers.), ésta pasaría a denominarse P. acutum. Sin embargo, estas sinonimias, nunca han sido publicadas. Esta es una de las razones de las confusiones en muchos trabajos, ya que algunos autores no han reconocido la identidad del género Parauronema (W. Foissner, 1971) y otros (J. Dragesco y A. Dragesco-Kerneis, 1986) como se ha podido observar, todavía siguen considerando la sinonimia Uronema acutum como especie definida dentro del género Uronema, citando indistintamente Parauronema virginianum y Parauronema acutum (P. Puytorac, J. Grain y col., 1987) como especies distintas.

El estudio morfológico llevado a cabo en el presente trabajo de Parauronema acutum, junto con el estudio detallado del resto de las especies incluidas en este género, no deja lugar a dudas que dicho género creado en principio por Thompson (J.C. Thompson, 1967), alberga una especie que presenta disimilitudes suficientes con el género Uronema para quedar fuera de él. Las discrepancias por tanto presentadas por Foissner (W. Foissner, 1971) en la creación de este género y la consideración de que dicha especie debe pertenecer al género Uronema, por muchos autores franceses, no parece acertada. En vista de los caracteres, tanto en vivo como tras la utilización de impregnaciones, las diferencias son lo suficientemente claras como para que se mantenga este género aparte, por lo tanto quedando Parauronema acutum establecida y siendo U. acutum y P. virginianum sinonimias de la anterior.

La delimitación morfológica de esta especie queda, como ciliación somática compuesta de once cinetias, con veintiún a veinticinco cinetosomas por cinetia (Tabla 25). Policinetia 1 (M1) ciliada con dos líneas de cuatro y cinco cinetosomas, quedando un cinetosoma sencillo anteriormente, muy cerca de la última cinetia de la que queda situada frente a las posiciones cinetosómicas primera, segunda y tercera, lo cual se traduce en una distancia al polo anterior celular de aproximadamente $2.5 \mu\text{m}$ (medida en impregnación con nitrato de plata). Su tamaño es mayor que el de la policinetia 1 en los morfotipos 1 y 2 ($2.7 \mu\text{m}$) Policinetia 2 (M2) compuesta siempre por tres líneas de cinetosomas, asimétricas posteriormente de 5, 3 y 2 cinetosomas respectivamente. La distancia entre las policinetias 1 y 2 entre 0.6 y $0.8 \mu\text{m}$ (medida en impregnación con nitrato de plata). Policinetia 3 (M3) compuesta por ocho cinetosomas dispuestos en tres líneas de cuatro, tres y un cinetosomas respectivamente, en posición oblicua respecto a la haplocinetia. Vestigio del escutico no ciliado, y con tres estructuras argentófilas dispuestas en línea al final del segmento B de la haplocinetia.

El morfotipo 4 perteneciente al clon Cil3, se ha identificado con la especie U. elegans, aunque el clon descrito en el presente trabajo, es más pequeño que los descritos anteriormente. Se ha observado gran variabilidad morfológica entre las descripciones encontradas de esta especie, aunque todas parecen coincidir en el elevado número de cinetias, que es el más alto de todas las especies incluidas en el género Uronema (A. Czapik, 1968; J.C. Thompson y E.S. Kaneshiro, 1968) (presente trabajo).

El número de cinetias en el caso del clon Cil3, disminuyó en cultivo, ya que al principio de su aislamiento el número de cinetias observado, fue más cercano al de las descripciones de la especie U. elegans, sin embargo, tras

un año en cultivo, el número de cinetias se estabilizó sobre una media de 18, aunque a diferencia del resto de los clones, el rango de variación del número de cinetias es más amplio (Figura 26). Otra característica distinta de las descripciones, es que el polo anterior no ciliado, parece ser más pequeño en este clon que en el resto de las descripciones estudiadas de U. elegans, lo cual puede ser debido al menor tamaño del clon descrito aquí.

La descripción este clon como U. elegans, es la primera que se lleva a cabo sobre dicha especie por medio de la impregnación con la técnica del carbonato de plata amoniacal. Esto ha permitido, una importante observación en alguna de las estructuras de este ciliado en comparación con las otras impregnaciones y con las otras descripciones, únicamente llevadas a cabo sobre ejemplares impregnados por medio de nitrato de plata. Así se ha revelado la más compleja composición de la policinetia M1, demostrada finalmente por medio de microscopía electrónica de transmisión.

La delimitación morfológica de esta especie queda, como: ciliación somática entre dieciséis y veintidós (media de dieciocho) cinetias, con diecinueve a veinticinco cinetosomas por cinetia (Tabla 25). La policinetia 1 (M1) no ciliada, con tres a cuatro cinetosomas, situada frente a la posición cinetosómica tercera y cuarta de la última cinetia somática (o segunda y cuarta), lo cual se traduce en una distancia al polo anterior celular entre 5.6 a 5.7 μm (medida en impregnación con nitrato de plata). La policinetia 2 (M2) compuesta siempre por tres líneas de cinetosomas, dos de 6 cinetosomas y la tercera de 2. Distancia entre las policinetias 1 y 2 entre 5 y 5.7 μm (medida en impregnación con nitrato de plata), la mayor encontrada de entre todos los clones estudiados. Policinetia 3 (M3) compuesta por nueve cinetosomas dispuestos en tres líneas de cuatro, tres y dos cinetosomas

respectivamente en posición oblicua respecto a la haplocinetia. Vestigio del escutico no ciliado, con tres estructuras argentófilas dispuestas en los vértices de un triángulo invertido al final del segmento B de la haplocinetia.

Finalmente el morfotipo 5, se ha incluido dentro de la especie U. filificum. Esta especie que fue transferida por (E.B. Small y H.D. Lynn, 1985) al nuevo género Urocyclon, como se ha discutido anteriormente, no se considera que deba ser transferida a dicho género, por lo tanto se propone que siga mantenida dentro del género Uronema, del que cumple todas las características morfológicas descritas hasta ahora. Se ha observado gran variabilidad morfológica de unas descripciones a otras en esta especie y de hecho, no se han podido catalogar con seguridad las descripciones de esta especie llevadas a cabo por (A.C. Borrór, 1963a) y por (E.B. Small y H.D. Lynn, 1985) como pertenecientes a este morfotipo, quizás, como ha ocurrido en U. marinum, se hayan incluido bajo el mismo nombre especies distintas, aunque este extremo no se ha podido comprobar en el presente trabajo. La única característica que sin embargo parece mantener todas estas descripciones bajo el mismo nombre es la del comportamiento característico de esta especie, descrito desde su primera cita por Kahl (A. Kahl, 1931), sin embargo, este comportamiento no ha sido observado en el clon estudiado aquí.

La delimitación morfológica de esta especie queda, como: ciliación somática entre trece y quince (media de dieciocho) cinetias, con dieciséis a diecinueve cinetosomas por cinetia (Tabla 25). La policinetia 1 (M1) no ciliada, con seis a siete cinetosomas y un tamaño de 3.1 a 3.3 μm , la mayor de todos los clones estudiados, está situada frente a la posición cinetosómicas segunda y cuarta de la última cinetia somática (o segunda y cuarta), lo cual se

traduce en una distancia al polo anterior celular entre 4.3 a 4.6 μm (medida en impregnación con nitrato de plata). La polycinetia 2 (M2) compuesta siempre por tres líneas de cinetosomas, de 5, 4 y 2 cinetosomas respectivamente, no rectas sino ligeramente inclinadas hacia la derecha. La distancia entre las polycinetias 1 y 2 entre 0.9 y 1.2 μm (medida en impregnación con nitrato de plata). Polycinetia 3 (M3) compuesta por ocho cinetosomas dispuestos en tres líneas de cuatro, tres y un cinetosoma respectivamente en posición oblicua respecto a la haplocinetia. Vestigio del escutico no ciliado, con tres estructuras argentófilas dispuestas en los vértices de un triángulo invertido al final del segmento B de la haplocinetia.

5.1.2. Microscopía electrónica de barrido y transmisión

Los datos encontrados en la bibliografía conjuntamente sobre ciliación somática o bucal por medio de la utilización de microscopía electrónica, en el género Uronema o en Paraaronema, se reducen prácticamente a dos trabajos publicados (E. Kaneshiro y G.G.J. Holz, 1976; M. Rodrigues de Santa Rosa y P. Puytorac, 1976).

El trabajo de (E. Kaneshiro y G.G.J. Holz, 1976), está dedicado principalmente al estudio de la ultraestructura celular, sobre varias estirpes pertenecientes al género Uronema. No se llevó a cabo el estudio de las estructuras del área bucal, o de la ciliación somática, excepto por la descripción del complejo basal del cilio caudal, dedicándose principalmente al estudio de la estructura celular.

El trabajo llevado a cabo por (M. Rodrigues-de-Santa-Rosa y P.D. Puytorac, 1976), sin embargo, estudia tanto ciliación somática como bucal en la

especie Parauronema virginianum, que como ya hemos discutido anteriormente es en realidad P. acutum.

Las observaciones llevada a cabo sobre la ciliación somática y bucal en los clones estudiados (U. marinum, P. acutum, Cil3) por medio de microscopía electrónica de barrido, han sido de utilidad para la determinación correcta del tipo de ciliación presente y su disposición en la superficie celular. Este tipo de estudio no ha sido nunca llevado a cabo en detalle, con este tipo de microscopía, en estos ciliados. Sólo existe un trabajo de morfología que incluya alguna descripción con este tipo de técnica (O. Coppellotti, 1990), sin embargo no produce ningún detalles del área bucal. Entre las conclusiones principales, están la comprobación de la doble ciliación en la parte anterior celular, mientras que la posterior presenta ciliación sencilla, observación que se había llevado a cabo de todas maneras, por medio de las impregnaciones y las observaciones en vivo con microscopía óptica.

Se ha observado que la presencia de numerosos mucocistos, observados también por medio de microscopía electrónica de transmisión, son expulsados durante el tratamiento llevado a cabo, esto ha permitido en algunos casos, determinar la situación de mucocistos, que se observaron por medio de las impregnaciones, como manchas argentófilas. Por ejemplo, la situación de mucocistos en el área del vestigio del escutico (Cil3).

Otras observaciones, han sido la comprobación en todos los casos de la presencia en las células en interfase en el área del vestigio del escutico -que no es ciliado-, de poros, exactamente en la situación en la que se observan las manchas argentófilas -que se han considerado como vestigio del escutico-, por medio de las impregnaciones. Esta es la primera observación llevada a cabo sobre estos

ciliados y hace pensar si las observaciones llevadas a cabo por ejemplo en el caso de la impregnación con nitrato de plata, no sería deposición física de sales de plata en dichos poros, lo que se observa como vestigio del escutico.

Se ha comprobado asimismo, como las estrias peliculares, deben ser las áreas donde se produce deposición física de las sales de plata durante la impregnación con nitrato de plata, ya que se corresponden con las líneas argentófilas observadas en dicha impregnación. Estas líneas parecen corresponderse, asimismo, con los límites de las vesículas alveolares - como en Cil3- como otros autores han observado también (Dippell, R.V., 1962; Hiller, S.A. y Bardele, C.F., 1988; Lynn, D.H., 1977).

Las crestas observadas por medio de microscopía electrónica de barrido, en los tres clones estudiados - Uronema marinum, Parauronema acutum y Cil3-, no han sido descritas anteriormente en el género Uronema, ya que excepto el trabajo de (O. Coppellotti, 1990), este tipo de estudio no ha sido llevado a cabo en estas especies. Sin embargo, este tipo de estructuras, se han observado descritas en algunos estudios de microscopía electrónica de transmisión en otros géneros de escuticociliados, como por ejemplo para el caso de Cinetochilum, por medio de microscopía electrónica de transmisión (Puytorac, P. y col., 1974a), o en el género Parauronema localizadas separando membranelas adyacentes (M. Rodriguez-de-Santa-Rosay P.D. Puytorac, 1976), siendo denominados por esta causa como crestas intermembranales.

La situación de estos repliegues o crestas presenta una situación típicamente regular y constante en todos los clones estudiados, por lo que, aunque en un principio se pensó en la presencia de artefactos, el estudio posterior y búsqueda de correlación con el trabajo de microscopía

electrónica de transmisión y otros estudios sobre escuticociliados en la bibliografía, pareció confirmar su presencia en dichas áreas.

La presencia de estas crestas tan característica, es llamativa, sobre todo en el caso del área de la policinetia 1 o M1, ya que dicha policinetia, no es ciliada en U. marinum y Cil3. Se ha pensado que probablemente estas estructuras puedan representar alguna función en los mecanismos de predación por filtración de partículas en suspensión. Fenchel (Fenchel, T., 1986) describiendo su modelo de predación por filtración, asume en su estudio sobre Uronema, que la mayor eficiencia en la predación de estos ciliados con respecto a Cyclidium, subyace en la presencia de las policinetias M1 y M2 ambas ciliadas, sobresaliendo sobre la región bucal y entre las cuales se produce la intercepción de partículas. Este autor describe unas líneas de flujo hidrodinámico entre ambas policinetias -que asume ciliadas- que a este nivel alcanzan velocidades mucho mayores, flujos que fueron estudiados por medio de grabaciones en video. Sin embargo, la policinetia 1 o M1, no es ciliada en Uronema, por lo tanto si estos mecanismos fueron observados de esta manera, debe ser por en dicha área, existe algún otro tipo de estructura que pueda presentar las mismas oposición al flujo que si existiera una línea de cilios, como por ejemplo, este tipo de crestas. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido comprobada en el presente trabajo y debe ser considerada como meramente especulativa.

El caso del estudio por medio de microscopía electrónica de transmisión, llama la atención una característica, común a todos los escuticociliados que han sido estudiados, que es la presencia de mitocondrias gigantes en la periferia celular, entre las cinetias contiguas de un extremo al otro de la célula, que forman el condrioma (Didier, P. y Detcheva, R., 1974; E. Kaneshiro

y G.G.J. Holz, 1976; P. Puytorac, P. Didier y col., 1974a; Puytorac, P.d. y col., 1966; M. Rodriguez de Santa Rosa y P.D. Puytorac, 1976).

Estas mitocondrias o condriocitos, son muy regulares en los casos de U. marinum, SRBM y P. acutum, sin embargo, parecen ser más irregulares en el clon Cil3 donde se pueden ver frecuentes ramificaciones hacia el interior celular. En algunos casos estas parecen estar asociadas al RER y a un sistema de membranas que ha sido denominado como "Fluid Segregation Organelle", del cual se ha sugerido una función de asociación con los componentes de la vacuola contráctil, jugando probablemente algún papel en la regulación osmótica del ciliado (E. Kaneshiro y G.G.J. Holz, 1976; McKanna, J.A., 1976). Estas características fueron observadas tanto en el clon de P. acutum, como en Cil3. En este último parece que si existe continuidad entre dichas estructuras. Se ha discutido por otros autores, si este sistema, estaría más desarrollado en las especies marinas que en las dulceacuícolas (E. Kaneshiro y G.G.J. Holz, 1976), sin embargo, aunque este tipo de asociación fue más fácilmente observable en los tres clones marinos, no se pudo observar claramente en SRBM, ya que la observación de estructuras u orgánulos citoplásmicos en este clon, fue entorpecida por la muy abundante presencia de ribosomas que produjeron un aspecto muy denso a los electrones.

Las vesículas discoidales observadas en el caso de U. marinum descritas de la misma manera en otros ciliados (E. Kaneshiro y G.G.J. Holz, 1976; Puytorac, P.d., 1967; P.d. Puytorac, P. Didier y col., 1974a) no se observaron en P. acutum. Si se observaron en este último, sin embargo, numerosas vesículas globulares, las cuales se han observado también en otros escuticociliados (P. Didier y R. Detcheva, 1974).

El estudio de la infraciliación celular, resultó de

gran ayuda en la identificación de algunos casos dudosos, sobre la presencia de cinetias con dobles cinetosomas a lo largo de ellas o anteriormente dobles y posteriormente sencillos. En todos los casos estudiados, se comprobó la presencia de cinetosomas dobles en la parte anterior celular y sencillos en la posterior. La disposición típica de los sacos parasómicos en la cinetida entre los cinetosomas y a su izquierda observada en los cuatro clones estudiados ha sido observada también en otros escuticociliados (P. Didier y R. Detcheva, 1974; P. Puytorac, M. Roque y col., 1966) o en el caso de los cinetosomas sencillos en la región posterior celular, sobre el cinetosoma ligeramente desviado a su izquierda (E. Kaneshiro y G.G.J. Holz, 1976; P. Puytorac, P. Didier y col., 1974a).

Las fibras asociadas postciliares y transversas, en la típica disposición diametralmente opuesta (Lynn, D.H. y Corliss, J.O., 1991), están compuestas por cuatro microtúbulos, como se ha observado en otros escuticociliados (P. Puytorac, P. Didier y col., 1974a; M. Rodrigues de Santa Rosa y P. Puytorac, 1976), sin embargo, el ciliado de agua dulce SRBM, parecía portar un mayor número de estas (seis microtúbulos). Esta variación se ha observado, asimismo en otros escuticociliados (P. Didieri y R. Detcheva, 1974).

La observación clara de fibras postciliares, en secciones sagitales de la haplocinetia en algunos de los clones, fueron de gran ayuda, para la identificación del cinetosoma posterior del anterior en las diadas, como fue comprobado en otros escuticociliados por otros autores (P. Didier y R. Detcheva, 1974; M. Rodrigues de Santa Rosa y P. Puytorac, 1976).

La haplocinetia, se pudo comprobar en los casos estudiados, presentó una línea externa de sacos

parasómicos, que quedan impregnados con la técnica de carbonato de plata amoniacal. Esta disposición ha sido descrita, asimismo, para P. acutum (M. Rodrigues de Santa Rosa y P. Puytorac, 1976). Otras estructuras observables a este nivel fueron la presencia de inclusiones paraxonémicas o cuerpos intraciliarios descritas, asimismo, en P. acutum (M. Rodrigues de Santa Rosa y P. Puytorac, 1976).

Los mucocistos cuya sección transversal cuadrada, parece ser típica en otros escuticociliados, no dejaron lugar a duda en la identificación de estos en los clones estudiados (P. Didier y R. Detcheva, 1974; E. Kaneshiro y G.G.J. Holz, 1976; M. Rodrigues de Santa Rosa y P. Puytorac, 1976), aparecieron frecuentemente entre cinetosomas contiguos en las cinetias somática, o entre cinetias adyacentes.

Se observó, asimismo, la presencia y disposición irregular de sacos parasómicos entre los cinetosomas de las polycinetias. Esta característica se ha observado citada en otros estudios en escuticociliados (P. Didier y R. Detcheva, 1974; M. Rodrigues de Santa Rosa y P. Puytorac, 1976), y como en el caso de los mucocistos, representan un problema a la hora de la identificación de ciertas estructuras, por medio de las impregnaciones.

La presencia de crestas, observada por medio de microscopía electrónica de barrido, se observó, asimismo, por medio de microscopía de transmisión. Estas han sido citadas en otros estudios, por medio de microscopía electrónica de transmisión, como crestas intermembranales, ya que la situación en la que se han observado fue entre polycinetias (P.d. Puytorac, P. Didier y col., 1974a; M. Rodrigues de Santa Rosa y P. Puytorac, 1976). Aunque en un principio no pareció clara, la presencia de esqueleto microtubular que las mantuviera, este parece estar

presente. La presencia de estas en Uronema, sin embargo, no ha sido nunca citada, ya que como se ha explicado, no se ha llevado nunca a cabo un estudio sobre morfología cortical en estas especies. Sin embargo, parece claro, por el presente trabajo comparativo entre los dos tipos de microscopía (barrido y transmisión), que la presencia de estas de una forma muy peculiar, aparece no sólo entre la haplocinetia y la policinetia M2, sino además a nivel de la policinetia M1, aunque esta no es ciliada (excepto en P. acutum).

La observación tanto de macro como de micronúcleo se pudo llevar a cabo únicamente en el clon Cil3. Como se ha descrito otras veces (E. Kaneshiro y G.G.J. Holz, 1976), estos quedan unidos por una membrana externa común. La estructura de ambos, asimismo, es la típica observada en dichos trabajos.

5.2. Estudio de las cinéticas de crecimiento

El estudio del potencial reproductivo en diferentes organismos es importante cuando se trata de evaluar la función llevada a cabo por éstos en determinados ecosistemas. Muchos autores han indicado el gran valor que la estimación de las tasas de crecimiento o la "tasa intrínseca de incremento natural" (r o μ) tiene en cualquier trabajo ecológico, ya que representa el valor reproductivo que permite hacer comparaciones entre distintos tipos de organismos (Fenchel, T., 1968b; Finlay, B.J., 1977; Ohman, M.D. y Snyder, R.A., 1991). La tasa de crecimiento puede tomar distintos valores, uno para cada grupo de factores ambientales en los que este organismo se encuentre (alimento adecuado, salinidad, temperatura, pH, etc), sin embargo, el valor de dicha tasa en las condiciones óptimas, será característico para la especie en cuestión.

Las tasas de crecimiento han sido por esta razón utilizadas en muchos casos para comparar generalmente organismos diferentes (Bernard, C. y Rassoulzadegan, F., 1990; T. Fenchel, 1968b; Fenchel, T., 1990; M.D. Ohman y R.A. Snyder, 1991; Rivier, A. y col., 1985; Taylor, W.D., 1978). La comparación entre organismos más cercanos, como aquellos pertenecientes a un mismo género, no parece haberse llevado a cabo. La excepción son los casos de Paramecium y Tetrahymena, precisamente por los problemas encontrados en la identificación de complejos de especies en estos dos géneros, tratando de proveer, de alguna manera, de caracteres que pudieran identificar la individualidad de unos clones con respecto a otros. El género Uronema presenta características, en la identificación de especies, que la colocan en la misma situación que estos dos géneros.

El estudio de las tasas de crecimiento y las variaciones de estas con distintos factores ambientales ha sido llevado a cabo, en el género Uronema, por diferentes autores y de muy diferentes maneras (Ashby, R.E., 1976; Berk, S.G. y col., 1976; T. Fenchel, 1968b; T. Fenchel, 1990; Gast, V., 1985; Hamilton, R.D. y Preslan, J.E., 1969; Hamilton, R.D. y Preslan, J.E., 1970; Hanna, S.A. y Lilly, D.M., 1974; M.D. Ohman y R.A. Snyder, 1991; Parker, J.G., 1976; Parker, J.G., 1978). La única característica común a todos estos trabajos ha sido el continuo uso de la especie U. marinum como especie tipo, representando al género Uronema. (Tabla 29).

Los estudios llevados a cabo sobre las características trofodinámicas de este género surgieron, como ya se ha indicado al principio, como punto base para otros estudios ecológicos, sobre el posible papel jugado por estos ciliados en la regeneración de nutrientes en las cadenas tróficas marinas (R.D. Hamilton y J.E. Preslan, 1969) o con la idea de utilizar este ciliado bacteriofago en estudios

de dinámica de poblaciones, en modelos predador-presa de medios marinos (R.E. Ashby, 1976; S.G. Berk, R.R. Colwelly col., 1976; J.G. Parker, 1976; W.D. Taylor, 1978).

Posteriormente, estudios sobre las características trofodinámicas en cultivo axénico (Hanna, B.A. y Lilly, D.M., 1970; Hanna, B.A. y Lilly, D.M., 1971; S.A. HannayD.M. Lilly, 1974; Lee, J.J. y col., 1971; Soldo, A.T. y Merlin, E.J., 1972) y la investigación de variedades nutricionales en la especie U.marinum (Hanna, B.A. y D.M.Lilly, 1972), surgieron con la posibilidad potencial de utilizar miembros de este grupo -fácilmente cultivables en laboratorio- en investigaciones de fisiología nutricional, como ya se había hecho de la misma manera anteriormente con Tetrahymena pyriformis.

Los estudios más recientes, sin embargo se han encargado de los mecanismos de predación por filtración de partículas en suspensión, que es típica en estos ciliados (T. Fenchel, 1986), del estudio *in situ* en condiciones naturales como predadores de bacterias (V. Gast, 1985; Taylor, G.T. y col., 1985; Turley, C.M. y col., 1986) o de la relativa importancia que la composición de las poblaciones puede representar en los patrones seguidos o en la eficiencia de estos en las cadenas tróficas marinas (M.D. Ohman y R.A. Snyder, 1991).

Autor	Especie	Origen
Fenchel, 1968a Hamilton y Preslan, 1969 Hamilton y Preslan, 1970 Hanna y Lilly, 1970 Hanna y Lilly, 1971 Lee, y col., 1971 Hanna y Lilly, 1972 Hanna y Lilly, 1974	<u>Uronema marina</u> <u>Uronema sp.</u> <u>Uronema sp.</u> <u>Uronema marinum</u> <u>Uronema marinum</u> <u>Uronema marinum</u> <u>Uronema marinum</u> <u>Uronema marinum</u>	Marino (Playa de Helsingør) Marino (Costa Baja California) Marino (Costa Baja California) Marino Marino Marino (Towd Point. Nueva York) Marino Marino (Port Washington. Nueva York)
Parker, 1976	<u>Uronema marinum</u>	Marino (Bahía de Robin Hood Bay. Arena intermareal)
Ashby, 1976	<u>Uronema marinum</u>	Marino (Bahía de Robin Hood Bay. Arena intermareal)
Berk y col., 1976	<u>Uronema nigricans</u>	Dulceacuícola. Río Rhode (cerca de la costa)
Parker, 1978	<u>Uronema marinum</u>	Marino (Bahía de Robin Hood Bay. Arena intermareal)
Gast, 1985	<u>Uronema marinum</u> <u>Uronema marinum</u>	Estuario (Estuario del Tees) Fiordo Schlei (Bahía Kiel) (5-20‰)
Taylor y col., 1985 Turley y col., 1986 Fenchel, 1990 Ohman y Snyder, 1991	<u>Uronema sp.</u> <u>Uronema sp.</u> <u>Uronema marinum</u> <u>Uronema sp.</u>	Los Angeles Harbour Canal de la Mancha Fiordo Lim (Dinamarca) Costa California (S. Diego)

Tabla 29.-

Trabajos sobre la caracterización de crecimiento en cultivo sobre especies del género Uronema.

No parece haber existido ningún interés en el género Uronema de estudiar características trofodinámicas entre diferentes clones o ni siquiera entre especies, ya que como se puede observar en la Tabla 29, prácticamente una única especie ha sido estudiada, mayoritariamente de origen marino. Sin embargo, dicho género incluye por lo menos cinco especies, de las que no se tiene prácticamente ningún dato funcional, excepto por la ya mencionada U. marinum o U. nigricans de la que sólo se ha encontrado un trabajo ((S.G. Berk, R.R. Colwelly col., 1976) (Tabla 29).

La comparación de estos trabajos se hace muy difícil, ya que las condiciones utilizadas en todos ellos varían enormemente. A estas dificultades se suman las dudas sobre las correctas identificaciones en dichos estudios, lo cual no es sorprendente, si tenemos en cuenta, como se ha podido observar en el punto anterior que la diferenciación entre algunas de las especies en este género todavía se sigue disputando, véase el caso de U. marinum y U. nigricans.

El presente trabajo fijó unas determinadas condiciones ambientales en cultivo, que no tienen por que ser las condiciones óptimas para cada uno de los clones, pero que establecen un punto de comparación entre ellos. El estudio morfológico detallado en este trabajo, junto con la obtención de las tasas de crecimiento a estas determinadas condiciones fijas de cultivo, proveen un marco ideal para la obtención de conclusiones sobre las adaptaciones que determinados morfotipos pueden presentar independientemente del medio en el que se encuentren.

Los resultados obtenidos en nuestro caso para una cada uno de los clones permiten diferenciar distintos tipos de mecanismos o comportamientos en los clones, con mayor tendencia a la estrategia de la K o la r según los morfotipos.

La correlación positiva entre el tiempo de duplicación (T_D) y el volumen celular en fase estacionaria, como se ha observado en otros trabajos, se observa en la comparación entre los distintos morfotipos. Sin embargo si consideramos el mismo dentro de un morfotipo la tendencia observada es exactamente la contraria, esto es, a mayor tiempo de duplicación menor volumen celular.

5.2.1. Curvas de crecimiento: tasas de crecimiento frente a producción celular

Las observaciones en los estudios bibliográficos llevados a cabo sobre el género Uronema han indicado que la fase de latencia es una variable dependiente de la edad del inóculo y del volumen de la célula, variable esta última que depende, asimismo, de la edad del cultivo (R.D. HamiltonyJ.E. Preslan, 1969; J.G. Parker, 1976). Esta observación, se tomó en cuenta a la hora de preparar los experimentos en cultivo, estandarizando la edad de los inóculos utilizados en los experimentos, lo que se tradujo, en todos los casos, en fases de latencia menores de diez horas.

La fase de latencia representan un área de la curva de crecimiento en que la relación presa/predador es muy grande. Todo el material incorporado durante esta fase es utilizado, única y exclusivamente, en el crecimiento de la célula, sin divisiones celulares, que sólo comienzan cuando las células alcanzan un determinado volumen, y es entonces cuando comienza termina la fase de latencia y comienza la fase exponencial (R.D. HamiltonyJ.E. Preslan, 1969; J.G. Parker, 1976).

El máximo volumen celular, en todos los clones estudiados, fue alcanzado al final de dicha fase de latencia. Este, en el morfotipo 1, no sobrepasó los 4,000

μm^3 , excepto en los casos de U. marinum, U. schewiakoffi y el clon Ta, que como se ha observado, presentaron unos tamaños mucho mayores que el resto de los ciliados pertenecientes al morfotipo 1 en ambas fases de crecimiento. El incremento en volumen de una fase de crecimiento a la otra fue mayor en estos clones también, seguidos por el clon X2. Fueron precisamente estos clones los que presentaron comportamientos dispares con respecto al resto de los clones del morfotipo 1, en tasas de crecimiento y en producciones celulares. Asimismo, dichos clones presentaron las mayores tasas de crecimiento pero una menor producción celular neta al final de la fase exponencial. Los valores respecto al volumen celular, alcanzado al final de la fase de latencia, encontrados en la bibliografía son muy variables y van desde un volumen de $3,000 \mu\text{m}^3$ (J.G. Parker, 1976) hasta $10,000 \mu\text{m}^3$ (R.D. HamiltonyJ.E. Preslan, 1969). Los volúmenes encontrados en el morfotipo 1, morfotipo al que se asume dichas estirpes de U. marinum pertenecían, se acercan más al primer valor, dependiendo del clon considerado, pero en ninguno de los casos estudiados se llegó a observar un volumen tan grande como el observado por (R.D. HamiltonyJ.E. Preslan, 1969).

Las fases exponenciales variaron, de un clon a otro, en su mayor o menor duración y en el número de células alcanzado al final de ésta, lo que se ha denominado como producción celular. Se ha discutido, en diferentes trabajos, que el final de la fase exponencial es la fase de la curva de crecimiento, en que la tasa presa/predador disminuye, siendo entonces cuando el volumen celular comienza a disminuir, posiblemente en respuesta a las nuevas condiciones, ya que la tasa de división no cambiaría tan rápido como la tasa de crecimiento (R.D. HamiltonyJ.E. Preslan, 1969). Conclusiones similares fueron obtenidas con una estirpe de U. marinum aislada de sedimentos marinos por (J.G. Parker, 1976). Por lo tanto, dicha tasa presa/predador disminuirá más lentamente en aquellos clones

que presentaron las fases exponenciales más largas (menores tasas de crecimiento). La producción celular en estos casos es específica en cada uno de los clones y depende de la concentración de presa inicial. Para la misma concentración de presa, en los experimentos llevados a cabo, algunos de los ciliados fueron extremadamente eficientes en la producción celular, por ejemplo, el clon X2 que presentó, asimismo, una alta tasa de crecimiento, fue uno de los clones más pequeños, pero su incremento en volumen de una fase a otra fue relativamente equiparable a los observados en los clones U. marinum, U. schewiakoffi.

Se ha observado que las tasas de crecimiento específicas para el morfotipo 1 presentan correlación negativa con la producción celular neta al final de la fase exponencial de crecimiento. Por lo tanto, para la misma concentración bacteriana a mayor tasa de crecimiento, menor será el rendimiento celular obtenido al final de la fase exponencial. En esta situación, los clones del morfotipo 1 que presentan menores tasas de crecimiento, sin embargo, exhiben la mayor producción celular y viceversa, en las mismas condiciones de cultivo. El primer comportamiento probablemente significa que dichos ciliados serán capaces de alcanzar la tasa máxima de crecimiento media a menores concentraciones de presa (bacterias) que los clones U. marinum y U. schewiakoffi. Esto sería indicativo de que, en situaciones de menores concentraciones de bacterias, U. marinum y U. schewiakoffi serían peores competidores. Estos resultados podrían ser explicados por un efecto de selección r sobre estos clones, ya que dichos clones han sido mantenidos durante bastantes años en cultivo, por lo tanto la ausencia de competición y el mantenimiento continuo de altas concentraciones de substrato o alimento en cultivo tiende a incrementar ligeramente las tasas de crecimiento, decreciendo la densidad de saturación. La producción celular o el rendimiento numérico neto al final de la fase exponencial de crecimiento será por lo tanto

menor para las mismas concentraciones de substrato en dichos clones (Luckinbill, L.S., 1979). Sin embargo, en el caso de Ta el mantenimiento en cultivo no se ha llevado a cabo como en estos dos clones (U. marinum y U. schewiakoffi) por tanto tiempo, y su comportamiento trofodinámico representa uno de los extremos del morfotipo 1 en cuanto a mayor tasa de crecimiento y menor producción celular.

Los competidores más eficientes tienden a presentar, por lo tanto, menores tasas de crecimiento y menores densidades de saturación (K_M) (L.S. Luckinbill, 1979). La competición en ambientes estables favorece, sin embargo, el incremento de la densidad de saturación, lo cual se ha observado en U. marinum y U. schewiakoffi por lo expuesto en el párrafo anterior. Sin embargo, la mayor habilidad competitiva es compatible sólo con tasas de crecimiento reducidas, mientras que los peores competidores deben tener, mayores tasas de crecimiento, esto permite deducir diferencias en la competitividad dentro del morfotipo 1, y asimismo entre los morfotipos estudiados (L.S. Luckinbill, 1979). Desde este punto de vista, el morfotipo 1, será peor competidor que el resto de los morfotipos (2, 3, 4 y 5), con menores tasas de crecimiento, sin embargo, esto parece ser contrarrestado con las mayores producciones celulares a la misma concentración de presa en el medio (excepto en los mencionados U. marinum, U. schewiakoffi y Ta).

5.2.2. Estudio trofodinámico comparativo de dos clones de Uronema

El estudio en las misma condiciones expuestas, ha considerando aquí, única y exclusivamente, los efectos sobre los parámetros trofodinámicos de las concentraciones de bacterias en el medio, ya que el resto de las

condiciones de cultivo han sido estudiados en otros trabajos (T. Fenchel, 1968a; R.D. HamiltonyJ.E. Preslan, 1969; R.D. HamiltonyJ.E. Preslan, 1970; S.A. HannayD.M. Lilly, 1974; J.G. Parker, 1976).

Existe abundante literatura que trata de explicar la habilidad de ciliados en general de discriminar entre diferentes cualidades de las partículas que pueden ingerir (Fenchel, T., 1980a; Fenchel, T., 1980b; Fenchel, T., 1980c). Se ha establecido el hecho de que las tasas de crecimiento son afectadas directamente por el tipo de estirpe bacteriana utilizada (Taylor, W.D. y Berger, J., 1976), lo cual no quiere decir que exista cierta selectividad en el tipo de partículas que pueden ser retenidas o ingeridas, ni tampoco produce evidencia directa de la diversificación de nichos entre las especies existentes. La mayoría de los trabajos publicados no suelen dar ninguna indicación de discriminación cualitativa de los organismos sobre las partículas en suspensión en las que predan. Por otro lado, algunos trabajos sí indican que pueda existir una cierta discriminación en el tamaño de las partículas ingeridas en función directa de las propiedades morfológicas de las áreas bucales del organismo en cuestión (T. Fenchel, 1980c; T. Fenchel, 1986).

La especificidad en el tipo de presa utilizado por distintos ciliados ha sido utilizada para explicar distribución espacial y sucesión temporal. Probablemente la especificidad en el tipo de presa utilizado implique otros aspectos ecológicos en protozoos, como la aparente riqueza de especies en comunidades de ciliados bacteriófagos. (Caron, D.A., 1990; W.D. TayloryJ. Berger, 1976)

En áreas pelágicas en el océano o en lagos, es interesante observar que las concentraciones de bacterias son demasiado bajas para poder mantener ciliados (D.A.

Caron, 1990; Fenchel, T., 1984; Fuhrman, J.A. y col., 1989; Rheinheimer, G., 1991; G.T. Taylor, R. Iturriaga col., 1985; C.M. Turley, R.C. Newell y col., 1986), de hecho es difícil encontrar ciliados consumidores exclusivos de bacterias en aguas abiertas. La excepción a esta regla serían lagos eutróficos o aguas en alto contenido orgánico donde las concentraciones de bacterias pueden exceder fácilmente 10^8 bacterias/mililitro, en las áreas intersticiales en sedimentos, o sobre lo que se ha dado en llamar "marine snow", término utilizado para describir el material floculento, formado principalmente por una matriz amorfa mucopolisacarida, donde los organismos quedan embebidos. La productividad primaria en estas áreas es muy alta, constituyendo uno de los mayores componentes del flujo de materia orgánica particulada en el océano (Herndl, G.J., 1992; Silver, M.W. y col., 1984).

En estas áreas pelágicas se ha propuesto que microflagelados heterotrofos serían los principales consumidores de producción bacteriana. Sin embargo, parece ser que en algunos casos no existe una correlación clara entre ambos, por ejemplo en áreas con mayores concentraciones bacterianas, lo cual ha propuesto la idea de que otros organismos fueran mejores predadores que estos microflagelados (Gasol, J.M. y Vaqué, D., 1993). En algunos sistemas marinos costeros, se han identificado a los ciliados como los principales predadores de bacterias (Sherr, E.B. y Sherr, B.F., 1987), siendo en algunos casos más eficientes que microflagelados (A. Rivier, D.C. Brownleey col., 1985). Entre estos ciliados están en posición eminente los escuticociliados, en su gran mayoría bacteriofagos y especialmente las especies pertenecientes al género Uronema. Sin embargo, no se han llevado a cabo muchos trabajos que estudien el papel que puede ser llevado a cabo directamente en el medio por este grupo.

El nicho más obvio para los ciliados consumidores de

bacterias es el de oportunistas, esto es explotadores tanto espacial como temporalmente de medios heterogéneos ("patchy"), pero no pueden ser responsabilizados del mantenimiento de las bajas concentraciones de bacterias en ambientes acuáticos oligotrofos (T. Fenchel, 1984; R.D. HamiltonyJ.E. Preslan, 1970). Esto no quiere decir que estas especies no estén bien adaptadas al océano, sino que están particularmente bien adaptadas a ciertos microambientes enriquecidos.

Teniendo en cuenta que teóricamente como se ha indicado, la morfología puede presentar un papel primordial en los resultados de predación y consumo de bacterias por los ciliados (T. Fenchel, 1980c; T. Fenchel, 1986), es interesante la comparación entre dos de los clones estudiados: *U. marinum* y SRBM, pertenecientes a dos morfotipos distintos. Estos muchas veces, como se ha podido comprobar en la bibliografía, han sido considerados como pertenecientes a la misma especie, debido a su similitud morfológica,. Sin embargo, presentan comportamientos ligeramente distintos con respecto a la capacidad predadora y a los mecanismos utilizados, lo cual pondría en entredicho la asunción en ciertos modelos ecológicos de similitud morfológica - capacidad predadora similar. Además de que los mecanismos utilizados para competir no parecen ser comparables, estas diferencias predadoras parecen sin embargo, tener algún sentido cuando se estudia en más detalle la morfología de los clones, ya que exactamente aquellos clones que se han identificado en ciertos morfotipos, parecen asimismo, presentar similitud en los parámetros trofodinámicos utilizados para la interpretación funcional.

El clon *U. marinum* para todas las bacterias estudiadas y todas las concentraciones de éstas, presenta siempre mayores tasas específicas de crecimiento (Figura 37). Se observó que en los dos casos, las mayores tasas específicas

de crecimiento se obtuvieron con la estirpe bacteriana *Vibrio natriegens* (NCIMB#857), mientras que las menores tasas específicas de crecimiento se obtuvieron, asimismo, en ambos clones con *Enterobacter aerogenes*, aunque el clon SRBM parece alcanzar similares tasas máximas de crecimiento sobre esta estirpe que sobre la estirpe RBM-1. Estos resultados, muestran, por tanto que el clon de SRBM a menores concentraciones bacterianas podrá ser mejor competidor en el medio en el que se encuentre que en el caso del clon U.marinum ya que alcanzará la tasa máxima media a concentraciones bacterianas menores que el clon U.marinum.

Los valores estimados de las constantes de saturación fueron menores para *E.aerogenes* y RBM-1 en el caso del clon SRBM, lo que indicaría la superioridad competitiva con este tipo de estirpes de este clon a bajas concentraciones bacterianas (Tabla 6). Sin embargo, como se puede observar el clon U.marinum, parece ser competitivamente superior en el caso de la estirpes *V.natriegens*, estirpe que como dicho clon es marina Esta bacteria parece ser grande para el tamaño normalmente encontrado en bacterias marinas (González, J.M. y col., 1990) y además presenta un alto contenido orgánico (M.D. Ohman y R.A. Snyder, 1991; Snyder, R.A., 1989) (Tabla 5).

Estos resultados parecen indicar que el valor nutricional de la estirpe *E. aerogenes* es el menor de entre los tres tipos de bacterias utilizados. La estirpe de mayor valor nutricional parece ser en ambos casos *V.natriegens*, cuyo contenido orgánico parece ser bastante alto (M.D. Ohman y R.A. Snyder, 1991; R.A. Snyder, 1989) aunque en el caso del clon SRBM los resultados con la estirpe RBM-1 son similares a los de *V.natriegens*. Lo cual podría ser indicativo de la menor preferencia de este clon por una bacteria de origen marino.

La preferencia por algunas estirpes bacterianas de ciliados pertenecientes al género Uronema ha sido estudiada en otros casos (S.G. Berk, R.R. Colwelly col., 1976; W.D. TayloryJ. Berger, 1976). (S.G. Berk, R.R. Colwelly col., 1976) estudiando varias estirpes de un ciliado identificado como U. nigricans, llevaron a cabo experimentos de la capacidad de predación de dicho ciliado sobre ciertas estirpes bacterianas a ciertas concentraciones. Observaron la preferencia por una estirpe de *Vibrio sp.* sobre una de *Bacillus sp.*, como se ha observado en el presente trabajo, la concentración bacteriana presentó un marcado efecto sobre la tasa de predación. En este trabajo, como en otros, se concluyó que la concentración crítica para el crecimiento de dichos ciliados se encuentra entre 10^6 - 10^7 bacterias/ml, concentraciones contempladas, asimismo, en el presente trabajo y en otros llevados a cabo con U. marinum. Lo que definitivamente relega a dichos ciliados a áreas en que las concentraciones bacterianas excedan dichos límites, donde probablemente jueguen un papel predador primario.

Sin embargo, la respuesta observada a dichas concentraciones, como se ha podido observar, será distinta dependiendo del morfotipo. Las tasas de crecimiento y las producciones celulares son radicalmente distintas en cada morfotipo y por tanto los medios de competición a ciertas concentraciones bacterianas son distintos.

5.3. Análisis morfométrico

El problema esencial en el análisis morfométrico es medir el grado de similitud de dos formas. Este tipo de aproximación aunque ha sido ampliamente utilizado, por medio de análisis multivariante en taxonomía o problemas de identificación en organismos superiores, no ha sido tan empleado en protistas, a pesar de que los casos en los que

se ha utilizado, por ejemplo en ciliados (Berger, J. y Hatzidimitriou, G., 1978; Gates, M.A. y Berger, J., 1974; Gates, M.A. y Berger, J., 1976; Gates, M.A. y col., 1975; Lynn, D.H. y Malcolm, J.R., 1983; Powelson, E.E. y col., 1975) han sido bastante útiles en la identificación.

Los principales análisis multivariantes utilizados en estos estudios para la identificación morfométrica han sido, análisis de componentes principales y variables canónicas. El análisis de variables canónicas es una técnica multivariante de análisis discriminante, mientras que el análisis de componentes principales no posee inherentemente máximo poder discriminante (M.A. Gates y J. Berger, 1974). En todos los estudios, la utilización de estas técnicas permitió la extracción de información sobre las variables o caracteres morfológicos que contribuían más a la discriminación entre clones o especies muy similares morfológicamente y asimismo, a la propia discriminación entre estas.

Los estudios se han llevado a cabo sobre ciliados en los que ha existido problemas en la identificación morfológica de especies por la presencia de complejos de especies y en especies parásitas en invertebrados principalmente en lo referente a la variación morfológica entre hospedadores. En todos los casos encontrados en la bibliografía, los resultados fueron positivos en la identificación morfométrica de "syngens" (o especies) y también de caracteres morfológicos importantes en la discriminación de los grupos. Estos trabajos se han llevado a cabo sobre Paramecium (M.A. Gates, E.E. Powelson y col., 1975; E.E. Powelson, M.A. Gates y col., 1975), sobre Tetrahymena pyriformis (M.A. Gates y J. Berger, 1974; M.A. Gates y J. Berger, 1976), en el género Colpoda (D.H. Lynn y J.R. Malcolm, 1983) y sobre el escuticociliado comensal Ancistrum mytili (J. Berger y G. Hatzidimitriou, 1978).

5.3.1. Consideraciones sobre las impregnaciones utilizadas

Las técnicas de impregnación basadas en la utilización de sales de plata como son protargol, carbonato de plata o nitrato de plata ponen de manifiesto cinetosomas tanto somáticos como bucales, así como otro tipo de estructuras selectivamente según la técnica utilizada. Estas técnicas han sido y son de importancia manifiesta en el estudio taxonómico de ciliados. Sin embargo, el uso exclusivo de una de estas técnicas debe ser observado con extrema cautela. En muchos casos se ha podido observar como el uso de diferentes técnicas puede dar lugar a resultados diferentes, que sólo pueden ser interpretados por medio del estudio comparativo de microscopio electrónica de barrido y de transmisión (Hiller, S.A., 1991; S.A. Hiller y C.F. Bardele, 1988). La identificación correcta de estructuras teñidas con componentes del cortex, sin un estudio comparativo ultraestructural previo, será en algunos casos imposible. Por ejemplo, la identificación de extrusomas -no ya la correcta identificación como toxicisto, mucocisto o tricocisto que sólo es posible por microscopía electrónica de transmisión- cinetosomas o sacos parasómicos, que aparecen como puntos impregnados sobre el sistema argentófilo o en las cinetias, no es posible cuando se utiliza un único tipo de impregnación.

La comparación de las distintas técnicas de impregnación con Uronema en el presente estudio, aunque no representa exactamente un problema en la identificación de especies, esto es cualitativo, si produjo en algunos casos problemas a la hora de identificar estructuras observables dependiendo de la técnica utilizada, de manera que la correcta identificación de estas estructuras sólo se pudo llevar a cabo por medio de la comparación de impregnaciones y en último caso por medio de microscopía electrónica.

Desde el punto de vista cuantitativo, si puede representar un problema, sin embargo, como ya han reseñado otros autores (Jeromé, C. y Montagnes, D., 1993; Jeromé, C.A. y col., 1993; M.D. Ohman y R.A. Snyder, 1991), en la utilización de estimaciones de tamaño de los ciliados, cuando se trata de evaluar biovolumen o biomasa de los datos obtenidos por medio de estas impregnaciones, ya que dependiendo del tipo de efecto se producirán estimaciones por encima o por debajo de los valores reales, por lo que se deberían estimar factores de conversión para cada caso.

5.3.1.1. Efectos cualitativos

***Carbonato de plata amoniacal* (D. Fernández-Galiano, 1976)**

La utilización de la técnica de carbonato de plata amoniacal (D. Fernández-Galiano, 1976), utilizada poco en los estudios morfológicos del género Uronema (G. Fernández-Leborans y M.C. Zaldumbide, 1984; C. Téllez, 1980; Téllez, C. y Fernández-Galiano, D., 1982) produce una calidad suficiente para el estudio morfológico detallado. Presenta el inconveniente, en algunos casos, de impregnar no sólo los cinetosomas, sino además, los sacos parasómicos, que se pueden confundir con cinetosomas. En estos casos, la información morfológica, aunque de muy buena calidad puede resultar confusa, ya que las descripciones de las mismas especies con otro tipo de tinciones no presentan todas las estructuras observables con esta técnica, lo que hace imprescindible la utilización de otra técnica cuando se esta llevando a cabo un estudio comparativo o simplemente si se trata de identificar, cuando se tiene como única base la descripción bibliográfica de las especies pertenecientes al género Uronema, que como ya se ha mencionado anteriormente han sido estudiadas principalmente, sino exclusivamente, con

la técnica de Chatton-Lwoff o de nitrato de plata. La identificación de las estructuras dudosas se llevó a cabo por medio de microscopía electrónica de barrido y de transmisión. En estos casos se aseguró la identificación de estructuras ciliadas o no, así como la presencia de sacos parasómicos, y la determinación del tipo de cinetias presentes, ya que en algunos casos existía la duda de la presencia de dicinetias completas en alguno de los clones.

Los casos estudiados en el presente trabajo, por ejemplo, los clones U. marinum, P. acutum, Cil3 y SRBM, demuestran lo expuesto anteriormente. Por medio de esta impregnación, se observó constantemente en la haplocinetia de una tercera línea externa de estructuras argentófilas, que el estudio de microscopía electrónica de transmisión reveló como una línea de sacos parasómicos, estructuras que son impregnadas con esta técnica.

Asimismo, la dificultad en la identificación de cinetosomas en las otras policinetias bucales, viene complicada por la presencia entre estos de sacos parasómicos, demostrados para algunos de los clones estudiados por medio de microscopía electrónica de transmisión (U. marinum, Cil3). Luego los conteos de estructuras argentófilas en esta impregnación deben ser tomados con cautela, por esta razón.

Nitrato de plata (Técnica de Chatton-Lwoff)

La gran mayoría de las descripciones morfológicas publicadas hasta ahora sobre el género Uronema, han sido llevadas a cabo prácticamente con un único tipo de impregnación con sales de plata, concretamente con la técnica de Chatton-Lwoff o nitrato de plata, lo cual hace bastante difícil la identificación exacta entre descripciones si se utiliza otro tipo de impregnación en

la identificación de especies pertenecientes a este género, como ha ocurrido cuando se han utilizado otro tipo de impregnaciones (Fernández-Leborans, G. y C. Zaldumbide, 1986; C. Téllez, 1980).

Esta impregnación pone de manifiesto las estructuras bucales, sin embargo es prácticamente imposible llevar a cabo conteos de cinetosomas en estas estructuras, como hemos podido comprobar y así se ha observado en las descripciones de otros autores (A.C. Borrór, 1963b; A. Czapik, 1964; A. Czapik, 1968; A.W. Jankowski, 1964; J.C. Thompson, 1964; J.C. Thompson, 1967; J.C. Thompson, 1972). Por esta razón, es con este tipo de impregnación con la que se han llevado a cabo medidas más detalladas de ciertas variables morfológicas, como la longitudes y anchuras de las policinetias, y haplocinetia, distancias entre policinetias, y distancias entre el polo anterior de la policinetia 1 (M1) y el polo anterior celular (J.C. Thompson, 1964; J.C. Thompson y F.R. Evans, 1968; J.C. Thompson y E.S. Kaneshiro, 1968), sin embargo, no se ha utilizado ningún otro tipo de técnicas estadísticas para juzgar diferencias entre las especies estudiadas, ni se ha llevado a cabo ningún tipo de análisis de la varianza. Los datos obtenidos de estas medidas, como se discutirá más adelante son, sin embargo, los que más se acercan a los observables en las células en vivo.

Como se ha descrito en el apartado de resultados esta técnica, pone de manifiesto la presencia de mucocistos (D.H. Lynn, 1977), sin embargo, no parece impregnar los sacos parasómicos en Uronema, a diferencia de los que otros autores han observado en otros géneros (S.A. Hiller y C.F. Bardele, 1988). Esta característica permitió la utilización de esta técnica, para la resolución de algunos conteos dudosos, en las estructuras impregnadas con carbonato de plata, principalmente en los conteos de la policinetia 1 (M1), en algunos de los clones estudiados (Cil3, Ta, Cil7,

etc).

El sistema de líneas argentófilo, que aparece con esta impregnación, parece coincidir con los surcos peliculares observados en la superficie celular, por medio de microscopía electrónica de barrido. Estos surcos peliculares, como se observó en alguno de los ciliados (Cil 3), se corresponden con los límites de las vesículas alveolares, como otros autores han señalado también (R.V. Dippell, 1962; S.A. Hiller y C.F. Bardele, 1988; D.H. Lynn, 1977).

Protargol

La utilización de la técnica de impregnación de protargol, no ha sido llevada a cabo normalmente en la descripción de las especies pertenecientes al género Uronema. Esta técnica es capaz de impregnar tanto las bases cinetosómicas (tripletes del axonema y gránulo axonómico) como cilios, macro y micronúcleo, que parecen sufrir cierta contracción por efecto de la tinción y las membranas interiores de los espacios alveolares (Zagon, I.S., 1970), se impregnan además mucocistos, que son expulsados durante la impregnación y cilios (Ahola, J., 1993). Sin embargo, no muestra ninguna afinidad por otro tipo de fibras asociadas a la infraciliación, ni por los sacos parasómicos que acompañan a los cinetosomas somáticos.

Todas estas características de selectividad por ciertas estructuras en la impregnación hubieran sido de gran utilidad a la hora de discriminar estructuras comparando las tres tinciones. Sin embargo, se comprobó que precisamente por esta alta especificidad, esta impregnación no parece ser muy útil en este tipo de ciliados, ya que toda la ciliación somática, queda teñida, no sólo los cinetosomas que suelen presentar gran afinidad por

protargol, sino también los cilios (J. Ahola, 1993; Small, E.B. y col., 1980; I.S. Zagon, 1970). Teniendo en cuenta que los cilios en estas especies suelen ser bastante largos, comparados con el tamaño celular, toda la infraciliación tanto somática como bucal fue prácticamente imposible de identificar, excepto en determinados casos, como Parauronema acutum o el clon Cil3, que son los únicos dos casos de los estudiados en este trabajo, en los que se han podido observar algunas de las estructuras bucales (Small, E.B. y Gross, M.E., 1985).

Esta técnica, por lo tanto, no ha sido de mucha utilidad en este estudio, ni cualitativa ni cuantitativamente, ya que no se pudieron llevar a cabo observaciones sobre las estructuras bucales ni somáticas, excepto en los casos indicados. La información obtenida únicamente sobre los datos de anchura y longitud celulares así como de macro y micronúcleo.

El único caso en el que se pudo utilizar algún detalle observado en esta impregnación fue en el caso del clon Cil3, para confirmar de nuevo la naturaleza cinetosómica de la estructura argentófila que se observó bajo la policinetia 1 (M1), con las impregnaciones de carbonato de plata y nitrato de plata.

Como se observó en el presente trabajo las dimensiones del material nuclear, quedan reducidas al producirse, durante la impregnación la condensación de este hacia el interior nuclear, aunque la membrana nuclear no queda impregnada, se presenta en la posición original, permitiendo la observación del tamaño nuclear original (I.S. Zagon, 1970).

5.3.1.2. Efectos cuantitativos

Los estudios de los efectos cuantitativos de los tratamientos realizados para el estudio sobre ciliados, son muy reducidos. Los principales trabajos que se han llevado a cabo, en este aspecto han surgido por problemas de estimaciones de biovolumenes o biomasa de ciliados, conociendo las dimensiones de estos, tras la fijación (Choi, J.W. y Stoecker, D.K., 1989; C.A. Jeromé, D.J.S. Montagnes y col., 1993; M.D. Ohman y R.A. Snyder, 1991) o tras un tipo de impregnación cuantitativo, por ejemplo en QPS² (C. Jeromé y D. Montagnes, 1993; C.A. Jeromé, D.J.S. Montagnes y col., 1993), en estudios ecológicos.

Dichos trabajos se han preocupado principalmente de los efectos producidos por la fijación con formol, lugol o Bouin (J.W. Choi y D.K. Stoecker, 1989; C.A. Jeromé, D.J.S. Montagnes y col., 1993; M.D. Ohman y R.A. Snyder, 1991), o en el caso de una impregnación, ha sido estudiado el QPS (C.A. Jeromé, D.J.S. Montagnes y col., 1993). Por lo tanto únicamente podemos hacer comparaciones en este último caso.

La impregnación con protargol (QPS), produce encogimiento de un 30-65% de la célula en vivo (C.A. Jeromé, D.J.S. Montagnes y col., 1993). Se comprobó en este trabajo que la fijación con Bouin -fijador utilizado en QPS- producía cierto encogimiento, menor que el observado con la impregnación completa de QPS. Probablemente en este último caso, la reducción debida al fijador de Bouin, utilizado en esta impregnación, era a su vez incrementado por el proceso de deshidratación en dicho tratamiento. Este tipo de observación se ha realizado, asimismo, en el presente trabajo. Los ciliados tras el tratamiento con protargol presentaron, como se observó en los resultados,

² Quantitative Protargol Staining (Montagnes, D.J.S. y Lynn, D.H., 1987)

un encogimiento celular. Parece sin embargo, que la técnica de QPS afecta de mayor manera al tamaño del ciliado que la técnica de protargol utilizada en este estudio. Este encogimiento fue diferencial dependiendo de la dimensión estudiada, afectando más a la dimensión longitud que a la anchura celulares. Se observó asimismo, un encogimiento diferencial dependiendo del clon, siendo algunos más afectados que otros, efecto observado por otros autores con otros fijadores (J.W. Choi y D.K. Stoecker, 1989; C.A. Jeromé, D.J.S. Montagnes y col., 1993). Las diferencias encontradas dependen también del estado nutricional del ciliado, efecto asimismo ha sido descrito en otros trabajos (M.D. Ohman y R.A. Snyder, 1991).

Las reducciones observadas, sin embargo, en los clones estudiados por medio de protargol, parecen ser mucho menores que las observadas para otros ciliados estudiados en otros trabajos. Esta observación ha sido llevada a cabo asimismo, sobre Uronema sp. por otros autores comparando otro tipo de fijación (C.A. Jeromé, D.J.S. Montagnes y col., 1993; Leahey, R.J.G., 1989).

Las observaciones llevadas a cabo sobre los efectos cuantitativos de las otras dos impregnaciones utilizadas - carbonato de plata y nitrato de plata- son inéditas, no pudiendo por lo tanto hacer comparaciones con otros estudios. En ambos casos, se producen dilataciones significativas por el uso de estas impregnaciones, a diferencia de lo observado con protargol, cuyo efecto general fue el encogimiento celular.

La impreganci3n con carbonato de plata amoniacal ha sido criticada, desde el punto de vista cuantitativo, precisamente por los puntos expuestos en el capítulo de resultados, sobre el aplastamiento celular producido. Este produce sobrestimaciones en las dimensiones celulares. Estas sobrestimaciones, como se ha comprobado, afectan

mayormente a la anchura celular y a la fase de crecimiento exponencial. De la misma manera ocurrió con las células tras la impregnación con nitrato de plata, aunque los efectos fueron menores que en el caso del carbonato de plata.

Estos resultados permiten concluir que la técnica que produce menores deformaciones celulares en conjunto es la de nitrato de plata, ya que sus dimensiones son las más cercanas a las observadas sobre las células en vivo. Por lo tanto de las impregnaciones utilizadas, la más cercana al estado celular en vivo sería esta impregnación y las mejores estimaciones de biovolumen provendrán de las medidas tomadas sobre células impregnadas por medio de esta técnica, aunque por supuesto, se debería de aplicar un factor de corrección, que como se ha observado dependerá del ciliado en cuestión. Lo más aconsejable sería el estudio del efecto para el ciliado en estudio.

Las siguientes impregnaciones son por orden protargol y carbonato de plata amoniacal.

5.3.2. Diferencias entre las fases de crecimiento: fases exponencial y estacionaria

A pesar de que se han anotado, en numerosos trabajos, las variaciones de tamaño a la largo de las distintas fases de crecimiento de Uronema en cultivo (R.E. Ashby, 1976; S.G. Berk, R.R. Colwelly col., 1976; T. Fenchel, 1968a; R.D. HamiltonyJ.E. Preslan, 1969; J.G. Parker, 1976), no se ha llevado a cabo ningún trabajo que examine diferencias entre distintos clones o como se ven afectadas cada una de las fases tras la aplicación de impregnaciones, lo cual como se ha mencionado en anteriormente es importante a la hora de la estimación de biovolúmenes o biomasa.

El volumen celular aumenta de fase exponencial a fase

estacionaria de dos a seis veces, siendo aquellos clones con mayor variación en volumen, los así mismo las mayores tasas de crecimiento (U. marinum, U. schewiakoffi y Ta) (Tabla 2).

El número de cinetias no parece verse afectado tan claramente, aunque en algunos de los clones la variabilidad en estas, parece ser mucho mayor en la fase exponencial. Asimismo, el número de cinetosomas por cinetia disminuye ligeramente de una fase a otra, siendo mayor en la fase exponencial de crecimiento. Por lo tanto no parece que el incremento en volumen tan grande afecte de la misma manera a otros estas variables.

El conteo del número de cinetias llevado a cabo en las dos fases de crecimiento (exponencial y estacionaria), sin embargo, indica que el número de cinetias suele ser mayor en la primera cinetia que en la última, y en la última mayor que en el resto, excepto en los clones del morfotipo 2 (AD1, AE22, SRBM y SCut 2.1) y 4 (Cil3), en los cuales la última cinetia parece presentar el mismo número o mayor de cinetosomas que la primera cinetia.

Los tamaños de las policinetias y las otras estructuras bucales se mantienen, aunque suelen ser ligeramente mayores en fase exponencial de crecimiento.

El objetivo de esta comparación fue la observación de si dichas variaciones entre ambas fases se pueden observar, asimismo, en la posición o tamaño de las estructuras utilizadas en los estudios morfológicos en la célula o simplemente el incremento en el volumen es proporcional y las células presentan un crecimiento alométrico, en el que las relaciones lineales entre las distintas variables estudiadas no se mantendrían. Esta observación es de utilidad principal a la hora de considerar dichas variables en la identificación de especies. Como en principio las

únicas variables comunes a todos los tratamientos fueron longitud y anchura celulares, estas fueron las únicas variables utilizadas en la comparación. Por medio del estudio de correlaciones con estas variables se observó que su posición relativa en la célula es distinta en una fase a otra.

Las conclusiones que podemos obtener de estos resultados se refieren al crecimiento celular, ya que dichas correlaciones positivas indicarían que el crecimiento en longitud está asociado con incrementos en las áreas interpolycinetia (M1 y M2 principalmente) y en las áreas entre el área bucal (B) y los polos anterior y posterior celular respectivamente, lo que apuntaría a dichas áreas como zonas de inserción pelicular durante el crecimiento en estos ciliados. La correlación positiva con el área bucal en este caso es debida precisamente a que dentro de dicha región estamos considerando la distancia interpolycinetia M1-M2 que correlaciona positivamente con la longitud y probablemente sea esta la principal región donde se produce inserción pelicular o elongamiento en el área bucal y no en las polycinetias o haplocinetia propiamente.

**5.3.3. Análisis estadístico multivariante:
análisis de variables canónicas.**

Para poder obtener una imagen coherente de la discriminación entre clones, el estudio de los resultados del análisis de variables canónicas, se llevó a cabo conjuntamente con los resultados obtenidos en las otras aproximaciones de este trabajo.

Los resultados procedentes del estudio en la impregnación con protargol o sobre las células en vivo, aunque producen cierta discriminación entre los clones, es pobre y no es suficiente para identificar ciertos clones, cuya identidad particular es conocida a priori.

En el caso de las células en vivo, la primera variable canónica es capaz de discriminar, entre los morfotipos 1 y 2, mientras que la segunda variable canónica, discrimina, de nuevo, alguno de los otros clones. En ambos casos la discriminación esta basada en tamaño celular (longitud, anchura y volumen celulares), esta discriminación, sin embargo, no tiene valor taxonómico, y de hecho es incapaz de discriminar clones que fueron claramente identificados como morfotipos discretos (P. acutum, Swil, etc).

El análisis llevado a cabo únicamente sobre el morfotipo 1 en vivo indica sin embargo, la discriminación entre los clones cuyos volúmenes eran similares (Cil1, AE21, AD2 y BBCil) y aquellos que se desviaban de este grupo, siendo o más pequeños (X2) o más grandes (U. marinum, U. schewiakoffi, Cil7 y Ta). Esta es una de las primeras indicaciones de las diferencias morfométricas encontradas en dicho morfotipo, que se ha considerado como perteneciente al grupo de especies de U. marinum. Por lo tanto únicamente la longitud y anchura celulares empiezan a indicar la heterogeneidad observable en este grupo de especies. Se ha de reseñar aquí que estos grupos observados

en base a dimensiones celulares, son los mismos grupos observados en el estudio de los parámetros trofodinámicos. Los clones Cil1, AE21, AD2 y BBCil, cuyos comportamientos en cuanto a tasas de crecimiento y producciones celulares fueron similares, se agrupan aquí también por medio de caracteres de tamaño, mientras que como en aquel caso el resto de los clones cuyo comportamiento fue diferente, quedan morfométricamente fuera del grupo principal.

El caso de la impregnación con protargol, en cuyo análisis quedaron incluidas además de las variables de longitud y anchura, aquellas correspondientes al macronúcleo, es capaz de discriminar entre todos los morfotipos. Sin embargo, aquellos clones identificados en el morfotipo 1 como U. schewiakoffi, Cil7 y Cil1 quedan muy separados del grupo principal perteneciente a dicho morfotipo, no sólo por tamaño celular, sino además por caracteres nucleares. Los casos de Cil7 y U. schewiakoffi, sin embargo, son consistentes con los observados en las células en vivo.

El caso del análisis llevado a cabo únicamente con los clones pertenecientes al morfotipo 1, mantiene las situaciones entre el grupo principal constituido por BBCil, AE21, U. marinum, AD2, Ta y X2 y los ya indicados Cil7, U. schewiakoffi y Cil1, por medio de la inclusión de caracteres macronucleares. Estos resultados aunque pueden incluir más información de tipo taxonómico (como es el macronúcleo), no parecen presentar ninguna relación con las observaciones funcionales llevadas a cabo anteriormente.

El análisis sobre todos los clones, tras la impregnación con nitrato de plata, produce la mejor discriminación posible entre ellos, si se consideran las observaciones llevadas a cabo en las otras partes de este trabajo. Los caracteres considerados en esta impregnación no incluyen el núcleo y sólo consideran datos de tamaño

celular, estructuras bucales y sus posiciones relativas tanto en la célula como entre ellas. En este caso, todos los morfotipos observados en la primera parte de este trabajo están claramente discriminados.

Los morfotipos 3, 4 y 5 pertenecientes a los clones Parauronema acatan, Cil3 y SWil respectivamente, aparecen claramente independientes de los morfotipos 1 y 2 que a su vez quedan separados entre ellos. Se debe indicar que la heterogeneidad observada en los análisis anteriores en el morfotipo 1, parece quedar establecida en este análisis. Los clones Cil7 y Ta quedan separados del grupo principal del morfotipo 1. Estos clones, aunque fueron incluidos dicho morfotipo, no hibridaron con la sonda molecular específica para U. marinum, y presentaron morfológicamente muy ligeras diferencias con el resto de los clones de dicho morfotipo. Funcionalmente, ambos quedaron fuera del grupo principal del morfotipo 1 que incluyó, como ya se ha indicado, los clones BBCil, AE21, AD2 y Cil1. El clon X2 también parece quedar fuera del agrupamiento principal del morfotipo 1 (U. marinum, U. schewiakoffi, Cil1, AE21, BBCil y AD2). Las principales diferencias morfológicas de este clon con el resto del morfotipo 1 se refieren únicamente al tamaño, pero este clon no hibridó tampoco con la sonda molecular de U. marinum, y además presentó un comportamiento funcional distante del grupo principal del morfotipo 1.

El caso del análisis llevado a cabo sobre los clones del morfotipo 1 tras la impregnación con nitrato de plata, vuelve a separar los clones Cil7 y Ta por un lado y X2 por otro, mucho más claramente. Esta vez queda fuera también del grupo principal el clon U. schewiakoffi (la variable canónica) probablemente por su mayor tamaño celular. La separación de los clones Cil7 y Ta, esta basada principalmente en sus caracteres de tamaño del área bucal completa (B), con una distancia media entre policinetias

(M1-M2) menor que el resto de los clones, así como su longitud en fase estacionaria. El clon X2, sin embargo, queda fuera del grupo principal por su menor longitud celular en todas las fases, así como su menor tamaño bucal en fase estacionaria.

Los resultados obtenidos por medio de la impregnación con carbonato de plata amoniacal sobre todos los clones, muestran claramente la discriminación por morfotipos observada por medio de la morfología clásica al principio de este trabajo en los dos primeros ejes canónicos. El clon SW11, sin embargo solapa con el morfotipo 2. Este morfotipo queda discriminado claramente cuando se considera la tercera variable canónica, por medio de características del área bucal en fase exponencial y distancia entre M1-M2 mucho menor que en los otros clones, así como la distancia PA-P, menor también en fase estacionaria. Estas observaciones encajan, también con los resultados funcionales, así como con los de la hibridación con las sondas moleculares.

El caso del estudio únicamente en el morfotipo 1, vuelve a discriminar los clones Cil7 y Ta por un lado y X2, por otro. Se observa, sin embargo, una incongruencia en este análisis por la discriminación del grupo principal del morfotipo 1 de los clones U. marinum y U. schewiakoffi. Estos clones siempre presentan diferencias que los separan del grupo principal, aunque en los otros análisis, como el de morfología clásica y el de hibridación con la sonda molecular específica, no discriminan. Estas diferencias se refieren al tamaño celular y también son observadas en el comportamiento funcional estudiado (tasas de crecimiento y producciones celulares). Probablemente la utilización de esta técnica, que como ya se ha indicado, es la que produce mayores deformaciones celulares, produzca la discriminación mayor de estos dos clones del grupo principal por esta razón.

Todos estos resultados, permiten producir una evaluación crítica sobre cual es la mejor técnica a utilizar para el estudio morfométrico, produciendo la mayor discriminación entre clones siendo ésta coherente con los resultados obtenidos en las otras aproximaciones. En este caso, por lo expuesto anteriormente, la mejor técnica discriminatoria morfométricamente es la impregnación con nitrato de plata seguida por la impregnación con carbonato de plata.

Las observaciones morfométricas sobre las impregnaciones con protargol y sobre las células en vivo, aunque no producen discriminación para la identificación taxonómica, sin embargo, si parecen discriminar funcionalmente los clones, ya que los resultados obtenidos en estas, fueron observados también en el estudio de las tasas de crecimiento y las producciones celulares de todos los clones.

5.4. Hibridaciones con sonda molecular

El análisis de las secuencias de rRNA pueden proveer medidas objetivas de divergencia entre grupos y por lo tanto de su relación filogenética (si asumimos que ambos proceden de un ancestro común) (Woese, C.R., 1987). Las secuencias de los genes del rRNA pertenecientes a la subunidad pequeña, amplificadas por medio de la técnica de PCR³ (Embley, T.M., 1991), permiten su secuenciación directa lo cual ha facilitado la utilización de estas y su aplicación principalmente en estudios filogenéticos. Sin embargo, estas moléculas representan un mosaico de áreas (secuencias) conservativas, semi-conservativas e hipervariables, que pueden ser utilizadas específicamente para la identificación de taxones a distintos niveles, por

³ Polymerase Chain Reaction

medio de sondas polinucleotídicas.

Las áreas hipervariables del gen son los puntos ideales para la utilización de sondas moleculares (polinucleotídicas), en la detección incluso a nivel específico, si son sintetizadas para ser capaces de hibridar con dichas áreas variables. Las regiones semiconservativas serían las áreas de elección de sondas específicas para la identificación de géneros y las áreas conservativas para el caso de suprataxones. Las "secuencias diana" (target sequences) existen en un alto número de copias en las células, ya que el número de ribosomas en la célula es bastante alto, por lo tanto las sondas para RNA son altamente sensitivas y esta característica junto con la gran conservación de secuencias en el rRNA, las hacen especialmente ideales para cualquier tipo de estudio filogenético o para la obtención de una medida objetiva en la identificación de taxones.

En el presente trabajo la utilización de una sonda molecular da idea de la cercanía o lejanía entre los distintos clones estudiados. La sonda utilizada, aunque fue preparada para la identificación del género Uronema, tomando como base la especie U. marinum (CCAP 1986/2), (especie de la que se aisló y secuenció una parte del gen codificando para la región V2 - hélice 10 - de la molécula de rRNA) da idea de cuales de los clones estudiados son más cercanos o cuales son más lejanos a la especie de la que se secuenció el gen, para la síntesis de la sonda. En este caso, los clones que presentan un morfotipo distinto (SW11, Cil3 y P.acutum), no hibridan con la sonda molecular, confirmando no sólo la distancia ya observada morfológicamente sino también a nivel molecular. La no hibridación de los clones corroboró, por lo tanto, la disimilitud morfológica, morfométrica y funcional de dichos clones con el de U.marinum (CCAP 1986/2).

Los clones X2, Ta y Cil7, que los métodos morfológicos clásicos incluyeron en el morfotipo de U.marinum (clon CCAP 1986/2), no hibridaron con la sonda específica. Esta disimilitud fue observada, asimismo, en el estudio morfométrico, luego la no hibridación confirma cierta separación de dichos clones del de U.marinum (CCAP 1986/2).

Los clones pertenecientes a U.marinum, U.schewiakoffi, AD2, AE21, Cil1 y BBCil hibridaron con la sonda específica para U.marinum (CCAP 1986/2), indicando en este caso la identidad molecular para el caso de la secuencia utilizada, identidad que fue observada también en el estudio por medio de morfología clásica, en el estudio morfométrico expuestos anteriormente. Por lo tanto, las variaciones observables en los caracteres morfológicos, morfométricos y funcionales de estos clones, han sido considerados como intraespecíficos, perteneciendo dichos clones a la especie U. marinum.

Se observa que la especie considerada en la morfología clásica como U. marinum, como ya se había indicado antes (J.C. Thompson, 1972), representa en realidad un complejo de especies. Se puede aproximar, por los resultados obtenidos con los clones aquí expuestos, que pueden existir al menos tres variedades distintas. Estas estarían representadas por los clones U. marinum, U.schewiakoffi, AD2, AE21, Cil1 y BBCil por un lado, y por otro por los clones Cil7 y Ta y clon X2. Los clones Cil7 y Ta quedan morfométricamente y por algunos caracteres observados por medio de el estudio morfológico clásico, muy cercanos, mientras que X2 queda morfométricamente y funcionalmente aparte de los otros dos grupos.

Los clones AD1, AE22, SRBM y Scut2.1 pertenecientes todos al mismo morfotipo, diferente del clon U.marinum (CCAP-1986/2) por medio de morfología clásica, han sido identificados sin embargo en la literatura con

descripciones tanto dentro de la especie U.nigricans (W.B. Song, 1991; J.C. Thompson y F.R. Evans, 1968) como con U.marinum (A. Czapik, 1964; B. Párduzc, 1939; C. Téllez, 1980). Estos clones no hibridaron con la sonda específica para U.marinum (CCAP-1986/2). Esta disimilitud molecular fue asimismo encontrada tanto con el estudio morfométrico como con el estudio de las cinéticas de crecimiento de dichos clones. Por lo tanto, dicho morfotipo debe ser considerado como una especie distinta, que como se ha observado en la discusión bibliográfica de la morfología clásica, coincide con U. nigricans. No se descarta la posibilidad de que dicha especie, como se ha observado en U. marinum, represente un complejo de especies, aunque ésta no se ha podido concluir en el presente trabajo.

Los conflictos entre evidencia molecular y morfológica se han sobrevalorado. Las aproximaciones llevadas a cabo en ambos campos tiene diferentes ventajas y desventajas pero los estudios que incorporen tanto datos moleculares como morfológicos, como se ha podido comprobar en el presente trabajo, proveerán mucho mejores descripciones e interpretaciones de diversidad biológica que aquellos enfocados únicamente en una de las dos direcciones. Este trabajo todavía representa uno de los pocos llevados a cabo en el que resultados moleculares se han utilizado conjuntamente con resultados morfológicos, para la identificación de especies. Su utilización conjunta, sin embargo, representa una herramienta de trabajo bastante poderosa para generar y comprobar hipótesis en la identificación de especies.

5.- CONCLUSIONES

1.- La comparación morfológica entre los clones estudiados y las descripciones recogidas en la bibliografía permite concluir que los clones del morfotipo 1 pertenecen a la especie U. marinum. Por lo tanto, esta especie se ha encontrado únicamente en medios marinos.

2.- Se concluye que la especie tradicionalmente considerada U. marinum, representada en el presente trabajo por los clones del morfotipo 1, constituye un complejo de especies de al menos tres taxones distintos.

3.- El morfotipo 2 pertenece a la especie U. nigricans y ésta se encuentra tanto en medios marinos como dulceacuícolas.

4.- La comparación del morfotipo 3 con las descripciones bibliográficas nos permite concluir que las especies Uronema acutum v. Buddenbrock, 1920 y Parauronema virginianum Thompson, 1967, son sinonimias de Parauronema acutum Thompson, 1967.

5.- Los morfotipos 4, identificado como U. elegans, y el morfotipo 5, identificado como U. filificum, se describen por primera vez por medio de la impregnación con carbonato de plata amoniacal. La comparación con las descripciones previas permite observar una gran variabilidad morfológica en ambas especies. Se sospecha que, como en el caso de U. marinum, dicha variabilidad pueda corresponder en ambos casos a dos complejos de especies.

6.- El morfotipo 1 presenta siempre tasas de crecimiento mayores que el resto de los morfotipos estudiados.

7.- Los mecanismos trofodinámicos utilizados por U. marinum (morfotipo 1) y los utilizados por SRBM (morfotipo 2), difieren tanto en las tasas de crecimiento como en las producciones celulares al final de la fase de

crecimiento exponencial.

8.- Las tasas de crecimiento y las producciones celulares en cultivo monoxénico de U. marinum y SRBM varían de manera similar con respecto al tipo de bacteria y a su concentración.

9.- Las células presentan crecimiento isométrico en sus estructuras y crecimiento alométrico de la anchura respecto a la longitud celular.

10.- La elongación celular hace variar la posición relativa de las estructuras en la célula. Las zonas preferentes de elongación son la región bajo el área bucal y la región entre las policinetias M1 y M2. Se deduce que, durante el crecimiento celular, es en estas zonas donde se realiza una mayor inserción pelicular.

11.- La impregnación con nitrato de plata es la técnica que produce menores deformaciones morfométricas en las células, quedando las proporciones de ambas dimensiones más cercanas a las observadas en las células en vivo, seguida inmediatamente por la impregnación con protargol y por último la impregnación con carbonato de plata. En todos los casos, la fase exponencial de crecimiento es la más afectada morfométricamente por la utilización de impregnaciones.

12.- La impregnación con carbonato de plata es la técnica que produce la mejor resolución cualitativa para la identificación de cinetosomas en las estructuras, seguida por la impregnación con nitrato de plata y finalmente por protargol. Se recomienda la utilización de al menos dos de estas técnicas en el estudio de ciliados.

13.- La impregnación con nitrato de plata produce la mejor discriminación morfométrica de los clones estudiados,

seguida por la impregnación con carbonato de plata.

14.- El tamaño de las estructuras bucales, la posición relativa entre ellas y en la célula con respecto a los polos anterior y posterior es importante en la identificación morfométrica precisa de los clones.

15.- El análisis de variables canónicas ha sido una técnica muy útil en la evaluación de la calidad de las impregnaciones, la discriminación de especies y la identificación de variables o factores que contribuyen a la discriminación morfométrica entre los distintos morfotipos, siendo posible la comprobación de la identidad morfométrica de las especies U. marinum, U. nigricans, y dentro de U. marinum la identificación morfométrica de tres grupos distintos.

16.- La utilización de la sonda molecular específica, ha demostrado su utilidad en la identificación de especies. Los clones que hibridaron con la sonda molecular quedan identificados como U. marinum. Este resultado ha permitido distinguir, al menos dos grupos en el morfotipo 1.

6. BIBLIOGRAFIA

Agamaliyev, F.G. (1974). Ciliates of the solid surface overgrowth of Caspian Sea. Acta Protozool., 13: 53-83.

Agamaliyev, F.G. (1978). Morphology of some free-living ciliates of the Caspian Sea. Acta Protozool., 17: 419-445.

Ahola, J. (1993). New method for prevention of mucotrichocysts expulsion in Uronema. J.Euk.Microbiol., 40(1): 44A.

Allen, R.D. (1974). Food vacuole membrane growth with microtubule-associated membrane transport in Paramecium. J.Cell.Biol., 63: 904-922.

Ashby, R.E. (1976). Long term variation in a protozoan chemostat culture. J.Exp.Mar.Biol.Ecol., 24: 227-235.

Berger, J. y Hatzidimitriou, G. (1978). Multivariate morphometric analysis of demic variation in Ancistrum mytili (Ciliophora: Scuticociliatida) commensal in two mytilid Pelecypods. Protistologica., 14(2): 133-153.

Berk, S.G., Colwell, R.R. y Small, E.B. (1976). A study of feeding responses to bacterial prey by estuarine ciliates. Trans.Amer.Micros.Soc., 95(3): 514-521.

Bernard, C. y Rassoulzadegan, F. (1990). Bacteria or microflagellates as a major food source for marine ciliates: possible implications for the microzooplankton. Mar.Ecol.Prog.Ser., 64: 147-155.

Blackith, R.E. y Reyment, R.A. (1971). Multivariate morphometrics. London, Academic Press Inc.

Borrer, A.C. (1963a). Morphology and ecology of some uncommon Ciliates from Alligator Harbor, Florida. Trans.Amer.Micros.Soc., 82(2): 125-131.

- Borror, A.C. (1963b). Morphology and ecology of the benthic ciliated Protozoa of Alligator Harbor, Florida. Arch.Protistenk., 106: 465-534.
- Borror, A.C. (1965). New and little-known tidal marsh Ciliates. Trans.Amer.Micros.Soc., 84: 550-565.
- Buddenbrock, W. von (1920). Beobachtungen über neue oder wenig bekannte marine Infusorien. Arch.Protistenk., 41: 341-364.
- Burkill, P.H. (1978). Quantitative aspects of the ecology of marine planktonic ciliated Protozoans with special reference to Uronema marinum Dujardin. University of Southampton.
- Bütschli, O. (1889). Protozoa. Abt. III. Infusoria und system der Radiolaria. Klassen und Ordnung des Thiers-Reichs. Leipzig, C.F Winter. 1098-2035.
- Caron, D.A. (1990). Growth of two species of bacterivorous nanoflagellates in batch and continuous culture, and implications for their planktonic existence. Marine Microbial Food Webs., 4(2): 143-159.
- Cheung, P.J. y col. (1980). Studies on the morphology of Uronema marinum Dujardin (Ciliata, Uronematidae) with a description of the histopathology of the infection in marine fishes. J.Fish.Dis., 3(4): 295-303.
- Choi, J.W. y Stoecker, D.K. (1989). Effects of fixation on cell volume of marine planktonic Protozoa. Appl.Environ.Microb., 55(7): 1761-1765.
- Cohn, F. (1866). Neue Infusorien im See aquarium. Z.Wiss.Zool., 16: 253-302.

- Coppellotti, O. (1990). Description of Uronema marinum (Ciliophora, Scuticociliatida) from the Antarctica and observations on the nuclear events in conjugation. Polar Biol., 10: 365-371.
- Corliss, J.O. (1953). Silver impregnation of ciliated Protozoa by the Chatton-Lwoff technique. Stain.Tech., 28(2): 97-100.
- Corliss, J.O. (1973). History, taxonomy, ecology and evolution of species of Tetrahymena. Biology of Tetrahymena. Dowden, Hutchinsonson & Ross, Inc. 1-55.
- Corliss, J.O. (1992). The interface between taxonomy and ecology in modern studies on the protists. Acta Protozool., 31: 1-9.
- Cuadras, C.M. (1991). Métodos de análisis multivariante. Barcelona, PPU.
- Cuenot, L. (1891). Protozoaires commensaux and parasites des Echinoderms. Note préliminaire. Rev.Biol.Nord.Fr., 3: 285-300.
- Curds, C.R. y Cockburn, A. (1968). Studies on the growth and feeding of Tetrahymena pyriformis in axenic and monoxenic culture. J.Gen.Microbiol., 54: 343-358.
- Czapik, A. (1964). La stomatogenèse de Cilié Uronema marinum Dujardin (Hymenostomatida, Tetrahymenina). Acta Protozool., 2: 207-211.
- Czapik, A. (1968). La morphologie de Uronema elegans Maupas et de Uronema parva sp.n. Acta.Protozool., 5(11): 225-229.
- Didier, P. y Detcheva, R. (1974). Observations sur le Cilié Cohnilembus verminus (O.F. Muller 1786): Morphogenèse de

bipartition et ultrastructure. Protistologica., 10(2): 159-174.

Dippell, R.V. (1962). The site of silver impregnation in *Paramecium aurelia*. J.Protozool., 9: 24.

Dragesco, J. y Dragesco-Kerneis, A. (1986). Ciliés libres de l'Afrique intertropicale. Introduction a la connaissance et a l'étude des Ciliés. Paris, Edition L'Orstom.

Dragesco, J. y Dragesco-Kerneis, A. (1991). Free-living Ciliates from the Coastal area of Lake Tanganyika (Africa). Europ.J.Protistol., 26: 216-235.

Dujardin, F. (1841). Histoire Naturelle des Zoophytes Infusoires. Paris,

Dyal, P.L., y col. (1992). Characterisation of Scuticociliates using RNA sequences nad fluorescent probes. Eur. J. Protist., 28(3): 337.

Embley, T.M. (1991). The linear PCR reaction: a simple and robust method for sequencing amplified rRNA genes. 13: 171-174.

Embley, T.M., y col. (1991). The use of fluorescent oligonucleotides for the identification of Ciliated Protozoa. 7th European Conference of Ciliated Protozoa and Molecular Biology of Ciliates, Toledo (Spain),

Embley, T.M., Finlay, B.J., Thomas, R.H., y col. (1992). The use of rRNA sequences and fluorescent probes to investigate the phylogenetic positions of the anaerobic ciliate Metopus palaeformis and its archaeobacterial endosymbiont. J.Gen.Microb., 138: 1479-1487.

Fabre-Domerge, P.L. (1885). Infusoires Ciliés de la Baie

Fenchel, T. (1968a). The ecology of marine microbenthos. II. The food of marine benthic Ciliates. *Ophelia.*, 5(1): 73-121.

Fenchel, T. (1968b). The ecology of marine microbenthos. III. The reproductive potential of Ciliates. *Ophelia.*, 5(1): 123-136.

Fenchel, T. (1980a). Relation between particle size selection and clearance in suspension-feeding Ciliates. *Limnol.Oceanogr.*, 25(4): 733-738.

Fenchel, T. (1980b). Suspension feeding in Ciliated Protozoa: feeding rates and their ecological significance. *Microb.Ecol.*, 6: 13-25.

Fenchel, T. (1980c). Suspension feeding in Ciliated Protozoa: Functional response and particle size selection. *Microb.Ecol.*, 6: 1-11.

Fenchel, T. (1984). Suspended marine bacteria as a food source. Flows of energy and material in marine ecosystems. *Theory and Practice*, NATO.

Fenchel, T. (1986). Protozoan filter feeding. *Progress in Protistology.*, 1: 65-113.

Fenchel, T. (1987). Ecology of Protozoa: the biology of free-living phagotrophic Protista.

Fenchel, T. (1990). Adaptative significance of polymorphic life cycles in Protozoa: responses to starvation and refeeding in two species of marine ciliates. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.*, 136: 159-177.

Fenchel, T. (1990). Adaptive significance of polymorphic life cycles in Protozoa: responses to starvation and refeeding in two species of marine ciliates. J.Exp.Mar.Biol.Ecol., 136: 159-177.

Fenchel, T. (1992). What can ecologists learn from microbes: life beneath a square centimetre of sediment surface. Functional Ecology., 6: 499-507.

Fernández-Galiano, D. (1976). Silver impregnation of ciliated protozoa: procedure yielding good results with the pyridinated silver carbonate method. Trans. Amer. Micros. Soc., 95(4): 557-560.

Fernández-Leborans, G. y Zaldumbide, M.C.d. (1984). Morphology of three species of free-living marine ciliata: Pseudocohnilembus cantabricus n.sp., Paralembus asturianus n.sp., Uronema castellonensis n.sp. (Ciliophora, Scuticociliatida). Arch.Protistenk., 128: 159-168.

Fernández-Leborans, G. y Zaldumbide, M.C.d. (1986). Two new marine scuticociliates: Pseudocohnilembus antoniensis and Pseudocohnilembus portuensis (Ciliophora). Microbios., 47: 7-22.

Finlay, B.J. (1977). The dependence of reproductive rate on cell size and temperature in freshwater ciliated Protozoa. Oecologia (Berl.), 30: 75-81.

Florentin, R. (1901). Description de deux infusoires ciliés nouveaux des mares salées de Lorraine. Ann.Sci.Nat. (Zool.), 12(4-6): 343-362.

Foissner, W. (1971). Das silberliniensystem von Uronema parduczi sp.n. (Ciliata, Hymenostomatida, Uronematidae). Arch.Protistenk., 113: 34-50.

Foissner, W. (1991). Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of Ciliated Protozoa. *Europ.J.Protistol.*, 27: 313-330.

Fuhrman, J.A., Sleeter, T.D., Carlson, C.A., y col. al. (1989). Dominance of bacterial biomass in the Sargasso Sea and its ecological implications. *Mar.Ecol.Prog.Ser.*, 57: 207-217.

Gasol, J.M. y Vaqué, D. (1993). Lack of coupling between heterotrophic nanoflagellates and bacteria: a general phenomenon across aquatic systems? *Limnol. Oceanogr.*, 38(3): 657-665.

Gates, M.A. y Berger, J. (1974). A biometric study of three strains of Tetrahymena pyriformis (Ciliates: Hymenostomatida). *Can.J.Zool.*, 52: 1167-1183.

Gates, M.A. y Berger, J. (1976). Morphological stability in Tetrahymena pyriformis. *Trans.Amer.Micros.Soc.*, 95(1): 11-22.

Gates, M.A., Powelson, E.E. y Berger, J. (1975). Syngenic ascertainment in Paramecium aurelia. *Syst.Zool.*, 23: 482-489.

Gates, M.A. y Berger, J. (1974). A biometric study of three strains of Tetrahymena pyriformis (Ciliates: Hymenostomatida). *Can.J.Zool.*, 52: 1167-1183.

Gates, M.A. y Berger, J. (1976). Morphological stability in Tetrahymena pyriformis. *Trans.Amer.Micros.Soc.*, 95(1): 11-22.

González, J.M., Iriberry, J., Egea, L., y col. (1990). Differential rates of digestion of bacteria by freshwater and marine phagotrophic protozoa. *Appl.Environ.Microbiol.*,

Gourret, P. y Roeser, P. (1888). Contribution a l'étude des Protozoaires de la Corse. Arch.Biol.Paris., 8: 139-204.

Grolière, C.A. (1976). Contribution a l'étude des Ciliés des sphaignes, cytologie, ecologie. Université de Clermont II.

Hamilton, R.D. y Preslan, J.E. (1969). Cultural characteristics of a pelagic marine Hymenostome Ciliate, Uronema sp. J.Exp.Mar.Biol.Ecol., 4: 90-99.

Hamilton, R.D. y Preslan, J.E. (1970). Observations on the continuous culture of a planktonic phagotrophic protozoan. J.Exp.Mar.Biol.Ecol., 5: 94-104.

Hanna, B.A. y Lilly, D.M. (1970). Axenic culture of Uronema marinum. Amer.Zool., 10: 539-540.

Hanna, B.A. y Lilly, D.M. (1971). Nutrition of axenic Uronema marinum. Amer.Zool., 11: 659.

Hanna, B.A. y Lilly D.M. (1972). Nutritional varieties of Uronema marinum. J.Protozool., 19(S): 37-.

Hanna, S.A. y Lilly, D.M. (1974). Growth of Uronema marinum in chemically defined medium. Mar.Biol., 26(153-160):

Herndl, G.J. (1992). Marine snow in the Northern Adriatic Sea: possible causes and consequences for a shallow ecosystem. Marine Microbial Food Webs., 6(2): 149-172.

Hiller, S.A. y Bardele, C.F. (1988). Prorodon alitolophon n.spec. and the "dorsal brush" as a character to identify certain subgroups in the genus Prorodon. Arch.Protistenk., 136: 213-236.

- Hiller, S.A. (1991). Bursellopsis spaniopogon n. spec. (Ciliophora: Prostomatida). I. Infraciliature and ultrastructure of the somatic and oral cortex. *Europ.J.Protistol.*, 27: 1-16.
- Hiller, S.A. y Bardele, C.F. (1988). Prorodon alitolophon n.spec. and the "dorsal brush" as a character to identify certain subgroups in the genus *Prorodon*. *Arch.Protistenk.*, 136: 213-236.
- Hillis, D.M. y Moritz, C. (1990). *Molecular systematics*. Sunderland, Massachusetts. USA, Sinauer Associates, Inc.
- Hoare, C.A. (1927). Studies on coprozoic Ciliates. *Parasitology.*, 19: 154-222.
- Jankowski, A.W. (1964). Morphology and evolution of Ciliophora. IV. Sapropelebionts of the family *Loxocephalidae* fam. nova, their taxonomy and evolutionary history. *Acta Protozool.*, 2: 33-58.
- Jankowski, A.W. (1980). Conspectus of a new system of the Phylum Ciliophora. *Trudy.Zool.Inst.Leningr.*, 94: 103-121.
- Jeromé, C.A., Montagnes, D.J.S. y Taylor, F.J.R. (1993). The effect of the quantitative protargol stain and Lugol's and Bouin's fixatives on cell size: a more accurate estimate of ciliate species biomass. *J.Euk.Microbiol.*, 40(3): 254-259.
- Kahl, A. (1926). Neue und wenig bekannte formen der Holotrichen und Heterotrichen Ciliaten. *Arch.Protistenk.*, 55(2): 197-438.
- Kahl, A. (1931). *Urtiere oder Protozoa I: Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria)*.

Kaneshiro, E. y Holz, G.G.J. (1976). Observations on the ultrastructure of Uronema spp., marine Scuticociliates. J.Protozool., 23(4): 503-517.

Kent, W.S. (1882). A manual of the Infusoria. Volume II. London.

Kloetzel, J.A. (1974). Feeding in ciliated protozoa. I. Pharyngeal disks in Euplotes: a source of membrane for food vacuole formation? J.Cell.Sci., 15: 379-401.

Leakey, R.J.G. (1989). The ecology of plancktonic ciliates in Southampton water. University of Southampton.

Lee, J.J., Tietjen, J.H. y Mastropaolo, C.A. (1971). Axenic culture of the marine Hymenostome Ciliate Uronema marinum in chemically defined medium. J.Protozool., 18(S): 10-.

Lepsi, J. (1926). Zur kenntnis einiger Holotrichen. Arch.Protistenk., 53: 378-406.

Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., y col. (1980). A newly revised classification of the Protozoa. J.Protozool., 27(1): 37-58.

Luckinbill, L.S. (1979). Selection and the r/K continuum in experimental populations of Protozoa. Amer.Nat., 113(3): 427-437.

Lynn, D.H. (1977). Ultrastructural sites of silver deposition in Chatton-Lwoff stained ciliated protozoa. J.Protozool., 24(suppl.): 10A.

Lynn, D.H. y Malcolm, J.R. (1983). A multivariate study of morphometric variation in species of the ciliate genus Colpoda (Ciliophora: Colpodida). Can.J.Zool., 61: 307-316.

Lynn, D.H. y Corliss, J.O. (1991). Ciliophora. Microscopic Anatomy of Invertebrates. Vol. 1. Protozoa. New York, Wiley-Liss, Inc. 1, ed. 333-467.

Madsen, H. (1931). Bemerkungen über einige entozoische und freilebende marine Infusorien der Gattungen Uronema, Cyclidium, Cristigera, Aspidisca und Entodiscus g.n. Zool.Anz., 96: 99-112.

Manly, F.J. (1986). Multivariate statistical methods: a primer. London, Chapman & Hall.

Martini, E. (1910). Über einien bei amöbenruhrähnlichen dysenterien vorkammenden Ciliaten. Zs.Hyg.Leipzig., 67: 387-390.

Maupas, E. (1883). Contribution a l'etude morphologique et anatomique des Infusoires Ciliés. Arch.Zool.Exp.Gen. (2e.Ser)., 1: 427-664.

Maxwell, A.E. (1977). Multivariate analysis in behavioural research. London, Chapman & Hall.

McKanna, J.A. (1976). Fine structure of fluid segregation organelles of Paramecium contractile vacuoles. J.Ultrastruct.Res., 54(1-10):

Montagnes, D.J.S. y Lynn, D.H. (1987). A quantitative protargol stain (QPS) for Ciliates: method description and test of its quantitative nature. Mar.Microb.Food Webs., 2(2): 83-93.

Nanney, D.L. (1989). What molecules tell us about evolution? Boll.Zool., 56: 205-221.

Nanney, D.L., Mobley, D.O., Preparata, R.M., y col. al. (1991). Eukaryotic origins: string analysis of 5S ribosomal

RNA sequences from some relevant organisms. J.Mol.Evol., 32: 316-327.

Nanney, D.L., Meyer, E.B., Simon, E.M., y col. al. (1989). Comparison of ribosomal and isozymic-phylogenies of Tetrahymenine Ciliates. J.Protozool., 36(1): 1-8.

Nanney, D.L., Cooper, L.E., Simon, E.M., y col. al. (1980). Isoenzymic characterization of three mating groups of the Tetrahymena pyriformis complex. J.Protozool., 27(4): 451-459.

Nanney, D.L. (1982). Genes and phenes in Tetrahymena. Bioscience., 32: 783-788.

Noland, L.E. (1937). Observations on marine Ciliates of the Gulf Coast of Florida. Trans.Amer.Micros.Soc., 56 : 161-171.

International code of zoological nomenclature.(1985). International Trust for Zoological Nomenclature. London

Ohman, M.D. y Snyder, R.A. (1991). Growth kinetics of the omnivorous oligotrich ciliate Strombidium sp. Limnology And Oceanography., 36(5): 922-935.

Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J., y col. al. (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. Adv.Microb.Ecol., 9: 1-55.

Párducz, B. (1934). Egy kevésbé ismert Hymenostomata véglény (Uronema marinum Duj.)alkata, különös tekintettel az ezüstuonalrendszerre. Acta Biol.Szeg., 3: 21-59.

Párducz, B. (1939a). Helyütő csillósok a Holotrichusok csoportjában. Acta Biol.Szeged., 5: 57-78.

Párduzc, B. (1939b). Körperbau und einige Lebenserscheinungen von Uronema marinum Duj. Arch.Protistenk., 92: 283-314.

Parker, J.G. (1976). Cultural characteristics of the marine Ciliated Protozoan Uronema marinum Dujardin. J.Exp.Mar.Biol.Ecol., 24: 213-226.

Parker, J.G. (1978). Further observations on cultures of the marine Ciliated Protozoan Uronema marinum Dujardin. J.Exp.Mar.Biol.Ecol., 35: 265-271.

Penard, E. (1922). Etudes sur les Infusoires d'eau douce. Geneve,

Pirt, S.J. (1975). Principles of Microbe and Cell cultivation. London, Blackwell Scientific Publications.

Pomroy, A.J. (1984). Direct count of bacteria preserved with lugol iodine solution. Appl.Environ.Microb., 47(5): 1191-1192.

Powelson, E.E., Gates, M.A. y Berger, J. (1975). A biometrical analysis of 22 stocks of four syngens of Paramecium aurelia. Can.J.Zool., 53: 19-32.

Preparata, R.M., Meyer, E.B., Preparata, F.P., y col. al. (1989). Ciliate evolution: The ribosomal phylogenies of the Tetrahymenine Ciliates. J.Mol.Evol., 28: 427-441.

Puytorac, P. de. (1967). Aspects de l'ultrastructure du Cilié Lembadion lucens (Maskell). Protistologica., 3(3): 269-274.

Puytorac, P. de., Didier, P., Detcheva, R., y col. (1974). Sur le morphogénèse de bipartition et l'ultrastructure du cilié Cinetochilum margaritaceum Perty. Protistologica., 10(2): 223-238.

Puytorac, P. de, Grain, J. y Mignot, J.P. (1987). Précis de protistologie. Paris, Société Nouvelle des Éditions Boubée.

Puytorac, P. de., Groliere, C., Roque, M., y col. (1974). A propos d'un cilié Philasterina trouvé dans la cavité générale du Polychète Nereis diversicolor O.F. Muller. Protistologica., 10(1): 101-111.

Puytorac, P. de., Roque, M. y Tuffrau, M. (1966). Étude cytologique du cilié Philaster digitiformis (Fabre-Domerge 1885). Protistologica., 2: 5-16.

Rheinheimer, G. (1991). Aquatic microbiology. John Wiley & Sons.

Rivier, A., Brownlee, D.C., Sheldon, R.W., y col. (1985). Growth of microzooplankton: a comparative study of bacterivorous Zooflagellates and Ciliates. Mar. Micro. Food. Webs. Paris., 1: 51-60.

Rodrigues de Santa Rosa, M. y Puytorac, P.D. (1976). A propos de l'ultrastructure du cilie Paraureonema virginianum Thompson, 1967. Les caractéristiques ultrastructurales des Cilies Scuticociliatida Small, 1967. Protistologica., 12(2): 321-334.

Roberts, D.M. y Causton, H. (1988). Silver nitrate impregnation of Ciliated Protozoa. Arch. Protistenk., 135: 299-318.

Schewiakoff, W. (1893). Über die geographische verbreitung der süßwasser - Protozoen. Mem. Ac. Imp. Sc. St. Petersburg. Ser. 7., 41:

Sherr, E.B. y Sherr, B.F. (1987). High rates of consumption of bacteria by pelagic Ciliates. Nature., 325: 710-711.

Sieburth, J.M. y Estep, K.W. (1985). Precise and meaningful terminology in marine microbial ecology. *Marine Microbial Food Webs.*, 1: 1-16.

Silver, M.W., Gowing, M.M., Brownlee, D.C., y col. (1984). Ciliated Protozoa associated with oceanic sinking detritus. *Nature.*, 309: 246-248.

Small, E.B. y Gross, M.E. (1985). Preliminary observations of protistan organisms, especially ciliates, from the 21°N hydrothermal vent site. *Biol.Soc.Wash.Bull.*, 6: 401-410.

Small, E.B. y Lynn, H.D. (1985). Phylum Ciliophora. En *An Illustrated Guide to the Protozoan. The society of Protozoology.* Kansas.

Small, E.B., Wetzel, B., Mangel, T.K., y col. (1980). Preliminary study of ciliates stained with silver albuminose (Protargol) examined in the backscattered electron mode with the SEM. *SEM.*, III: 543-548.

Snyder, R.A. (1989). Chemosensory mediated reactions of suspension-feeding ciliate protist to surface compounds of its bacterial prey. University of Maryland College Park.

Sogin, M.L. (1991). Early evolution and the origin of eukaryotes. *Current Opinion in Genetics and Development.*, 1: 457-463.

Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1981). *Biometry.* Freeman and Co. Ed. New York.

Soldo, A.T. y Merlin, E.J. (1972). The cultivation of symbiote-free marine Ciliates in axenic medium. *J.Protozool.*, 19(3): 519-524.

Song, W.B. (1991). Morphology and morphogenesis of the

fresh-water scuticociliate *Uronema nigricans* (Mueller, 1786). *Acta Zool. Sin.*, 37(3): 233-243.

Sonneborn, T.M. (1975). The *Paramecium aurelia* complex of fourteen sibling species. *Trans.Amer.Micros.Soc.*, 94(2): 155-178.

Stahl, D.A. y Amann, R. (1991). Development and application of nucleic acid probes. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons.

Steedman, H.F. (1985). *Zooplankton: fixation and preservation. Monographs on oceanographic methodology*. Paris, Unesco.

Stein, B.H. y Hamilton, R.D. (1969). *Uronema pelagica* n.sp. A new marine Hymenostome Ciliate. *Institute of Marine Resources (University of California)*.

Stokes, A.C. (1888). A preliminary contribution toward a history of the fresh-water infusoria of the United States. *J.Tren.Nat.His.Soc.*, 1(3): 183.

Taylor, W.D. y Berger, J. (1976). Growth responses of cohabiting ciliated Protozoa to various prey bacteria. *Can.J.Zool.*, 54: 1111-1114.

Taylor, W.D. (1978). Maximum growth rate, size and commonness in a community of bacterivorous Ciliates. *Oecologia(Berl.)*., 36: 263-272.

Taylor, G.T., Iturriaga, R. y Sullivan, C.W. (1985). Interactions of bacteriovorous grazers and heterotrophic bacteria with dissolved organic matter. *Mar.Ecol.Prog.Ser.*, 23: 129-141.

Téllez, C. (1980). Morfología cortical y morfogénesis en

trés generos de Escuticociliados Filasterinos (Uronema, Cinetochilum y Satrophilus). Universidad Complutense de Madrid.

Téllez, C. y Fernández-Galiano, D. (1982). Description et stomatogenese d'Uronema muscicola n.sp. (Ciliophora, Scuticociliatida). J.Protozool., 29(3): 522.

Téllez, C., y col. (1982). The ultrastructure of specimens of Paramecium multimicronucleatum impregnated with silver by the Fernandez-Galiano method. J.Protozool., 29(4): 627-634.

Thompson, J.C. (1964). A redescription of Uronema marinum and a proposed new family Uronematidae. Va.J.Sci., 15: 80-83.

Thompson, J.C. (1967). Parauronema virginianum n.g., n.sp., a marine Hymenostome Ciliate. J.Protozool., 14: 731-734.

Thompson, J.C. (1972). Ciliated Protozoa of the Antarctic Peninsula. Antartic.Res.Ser.Washington., 20: 261-288.

Thompson, J.C. y Croom, J.M. (1978). Systematics and Ecology of Ciliated Protozoa from King George Island, South Shetland Islands. Antartic.Res.Ser.Washington., 27: 41-67.

Thompson, J.C. y Evans, F.R. (1968). A redescription of Uronema nigricans. J.Protozool., 15(2): 369-374.

Thompson, J.C. y Kaneshiro, E.S. (1968). Redescription of Uronema filificum and Uronema elegans. J.Protozool., 15(1): 141-144.

Tucolesco, J. (1962). I. Espèces nouvelles d'Infusoires de la mer Noire et des Bassins salés paramarins. Arch.Protistenk., 106: 1-36.

Turley, C.M., Newell, R.C. y Robins, D.B. (1986). Survival strategies of two small marine ciliates and their role in regulating bacterial communitie structure under experimental conditions. Mar.Ecol.Prog.Ser., 33: 59-70.

Valvonesi, A. y Luporini, P. (1990). Description of two new species of Euplotes and Euplotes rariseta from Antartica. Polar Biol., 11: 47-53.

Wenzel, F. (1961). Einige neue oder wenig bekannte Ciliaten aus dem Golf von Neapel. Arch.Protistenk., 105: 259-268.

Wichterman, R. (1985). The biology of Paramecium. New York, Plenum Press.

Wilbert, N. y Kahan, D. (1981). Ciliates of Solar lake on the Red Sea Shore. Arch.Protistenk., 124(1): 70-95.

Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. Microbiol.Rev., 51: 255-271.

Yakimov, V. (1922). On the question of Uronema caudatum in men. Arch.Soc.Russe.Protist., 1: 134-135.

Yakimov, V. y Kolpakova, T. (1922). Protozoa of the intestine of man suffering with colitis. Arch.Soc.Russe.Protist., 1: 125-127

Zagon, I.S. (1970). Carchesium polypinum: cytostructure after protargol silver deposition. Trans.Amer.Micros.Soc., 89: 450-468.

LAMINAS

Lámina 1.- Clon Uronema marinum fijado con solución de Lugol. Objetivo 40x. Escala: 50 μ m.

a.- U. marinum en fase estacionaria.

b.- U. marinum en fase exponencial.



Lámina 1

Lámina 2.- Clon Uronema marinum. Objetivo 100x.
Escala: 10 μ m.

- a.- Impregnación con carbonato de plata amoniacoal sobre una célula en fase exponencial. La posición de la policineta 1 (M1) se puede observar entre los cinetosomas tercero y cuarto de la última cinetia somática. La flecha indica la posición del poro de la vacuola contráctil en el extremo posterior de la segunda cinetia somática.
- b.- Impregnación con carbonato de plata amoniacoal sobre una célula en fase estacionaria.
- c.- Impregnación con carbonato de plata amoniacoal sobre una célula en fase estacionaria.
- d.- Impregnación con carbonato de plata amoniacoal sobre una célula en fase estacionaria. Polo anterior celular.
- e.- Impregnación con carbonato de plata amoniacoal. Detalle del área bucal (M2, M3 y haplocinetia).
- f.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff) sobre una célula en fase estacionaria.
- g.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff) sobre una célula en fase estacionaria.
- h.- Impregnación con protargol sobre célula en fase estacionaria.
- i.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff) sobre una célula en fase estacionaria.
- j.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff) sobre células en fase estacionaria. Polos anterior y posterior celulares.

a



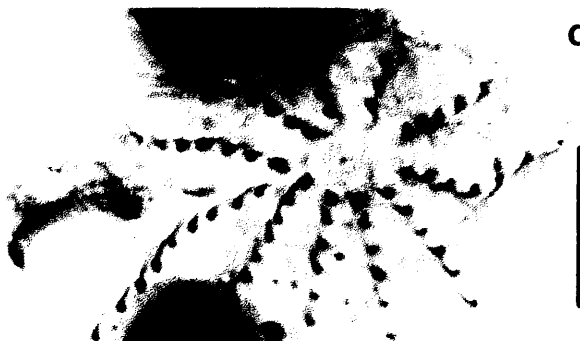
b



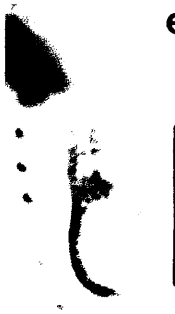
c



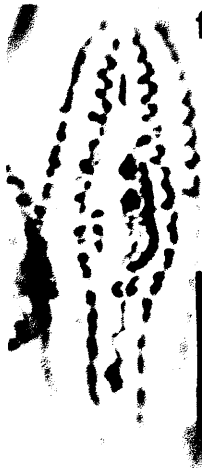
d



e



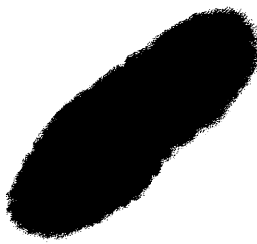
f



g



h



i

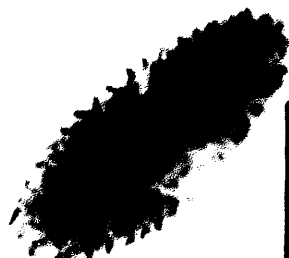


Lámina 3.- Clon Uronema marinum: microscopía electrónica de barrido.

- a.- Célula completa de Uronema marinum (CCAP no 1686/2). Detalles de la ciliación somática y bucal, policinetias M2 y M3, haplocinetia y las crestas (cr) o repliegues de membrana entre policinetias y sobre el área de la policinetia M1 (x3500). Escala: 2 μ m.
- b.- Detalle del área bucal, ciliación y crestas entre policinetias (x7000). Escala: 2 μ m.
- c.- Detalle del área del vestigio del escutico (x20000). Escala: 1 μ m.
- d.- Detalle del polo posterior, poro de la vacuola contráctil y área caudal (x12000). Escala: 1 μ m.



Lámina 4.- Clon Uronema marinum: microscopía electrónica de transmisión.

- a.- Detalle de la parte anterior de una cinetia somática con cinetosomas dobles y con cinetosomas sencillos. Ps: saco parasómico, Ks: cinetosomas, Kd: fibra cinetodésmica, Pc: microtubulos postciliares. Escala: 1 μ m.
- b.- Detalle de parte posterior en una cinetia somática. Ks: cinetosoma, Kd: fibra cinetodésmica, Pc: fibras postciliares, T: fibras transversas. Escala: 0,5 μ m.
- c.- Mucocistos localizados entre cinetosomas (Mu). Escala: 1 μ m.

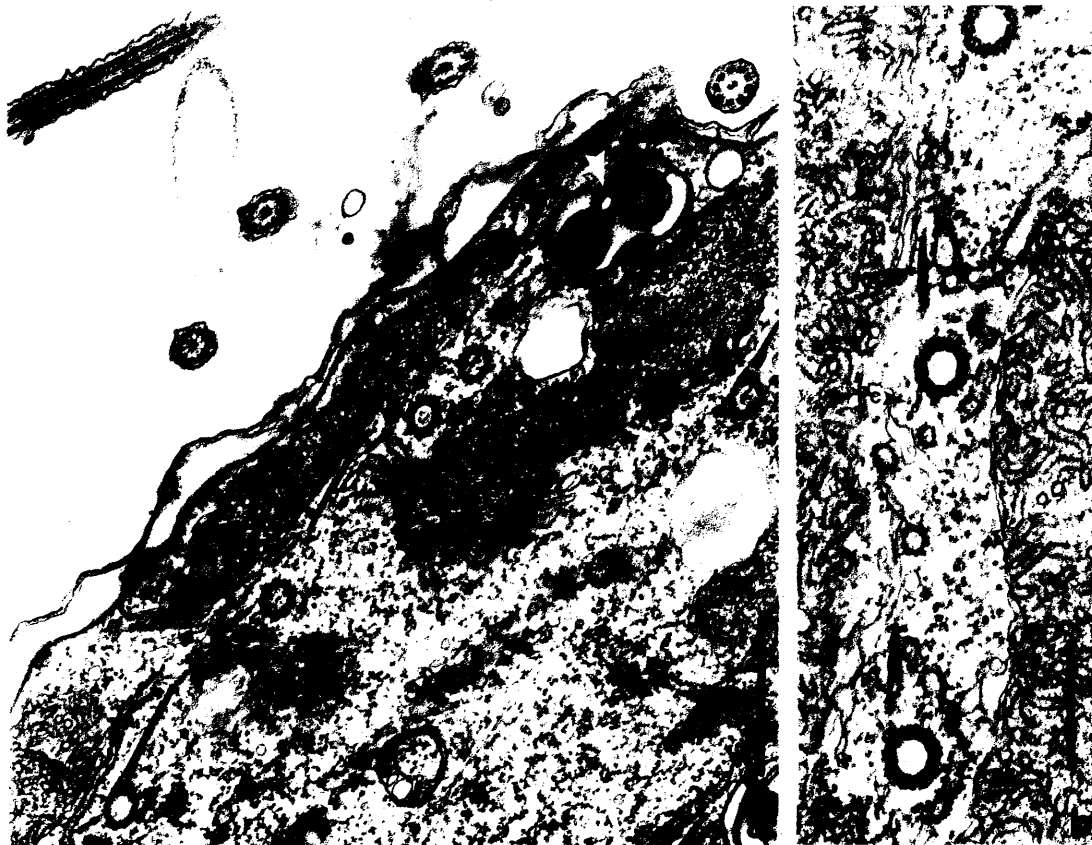


Lámina 5.- Clon Uronema marinum: microscopía electrónica de transmisión.

- a.- Sección tangencial del área bucal, polícinetias M2 y M3. Escala: 1 μm .
- b.- Detalle en el área bucal de la haplocinetia (PA). Escala: 1 μm .
- c.- Detalle de polícinetias M2, M3 y cilios de la haplocinetia (PA). Escala: 1 μm .
- d.- Detalle de polícinetias M2, M3 y parte de la haplocinetia. Escala: 1 μm .
- e.- Área bucal parte de la haplocinetia (PA) y polícinetia M3, vesículas discoidales (Vd). Escala: 1 μm .

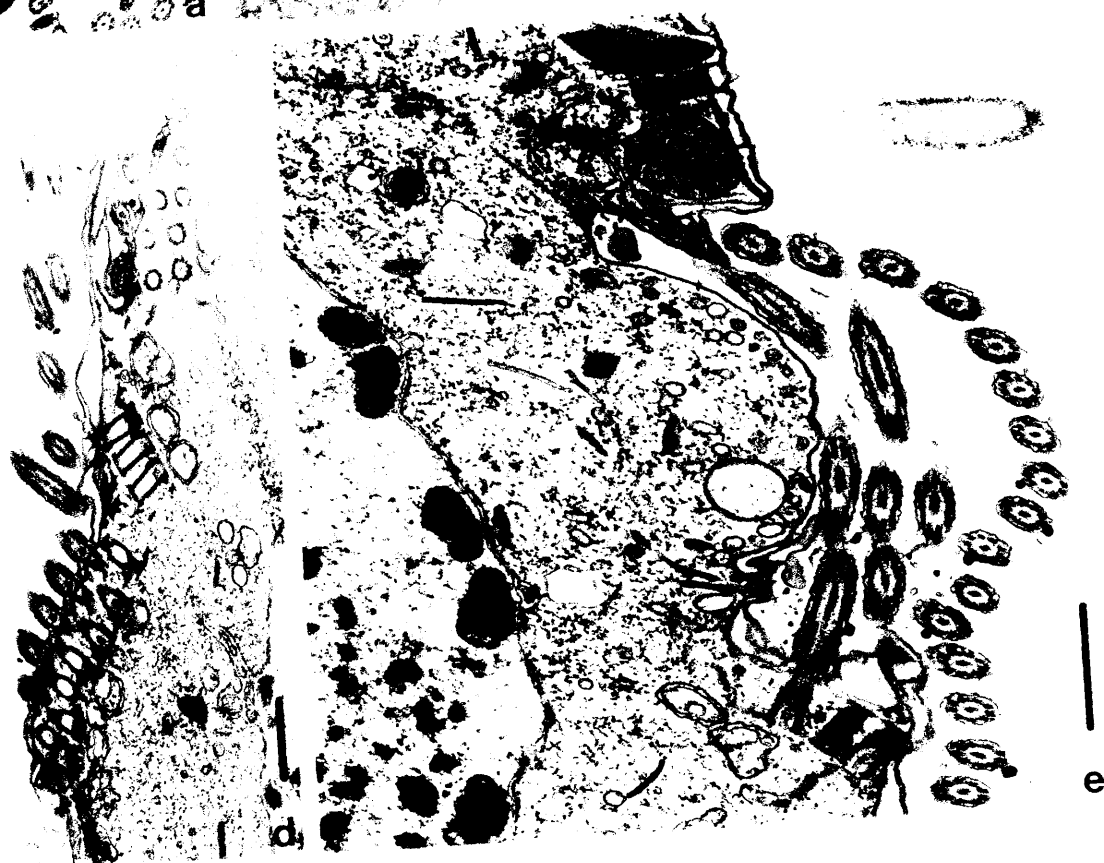


Lámina 6.- Clon Uronema schewiakoffi. Objetivo 10(x).
Escala: 10 μ m.

- a.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal sobre una célula en fase exponencial.
- b.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal sobre una célula en fase estacionaria.
- c.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal sobre una célula en fase estacionaria.
- d.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Célula en fase estacionaria.
- e.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Polo posterior celular.
- f.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal sobre una célula al principio de la fase exponencial.
- g.- Impregnación con protargol. Célula en fase estacionaria.
- h.- Impregnación con protargol. Célula en fase estacionaria.

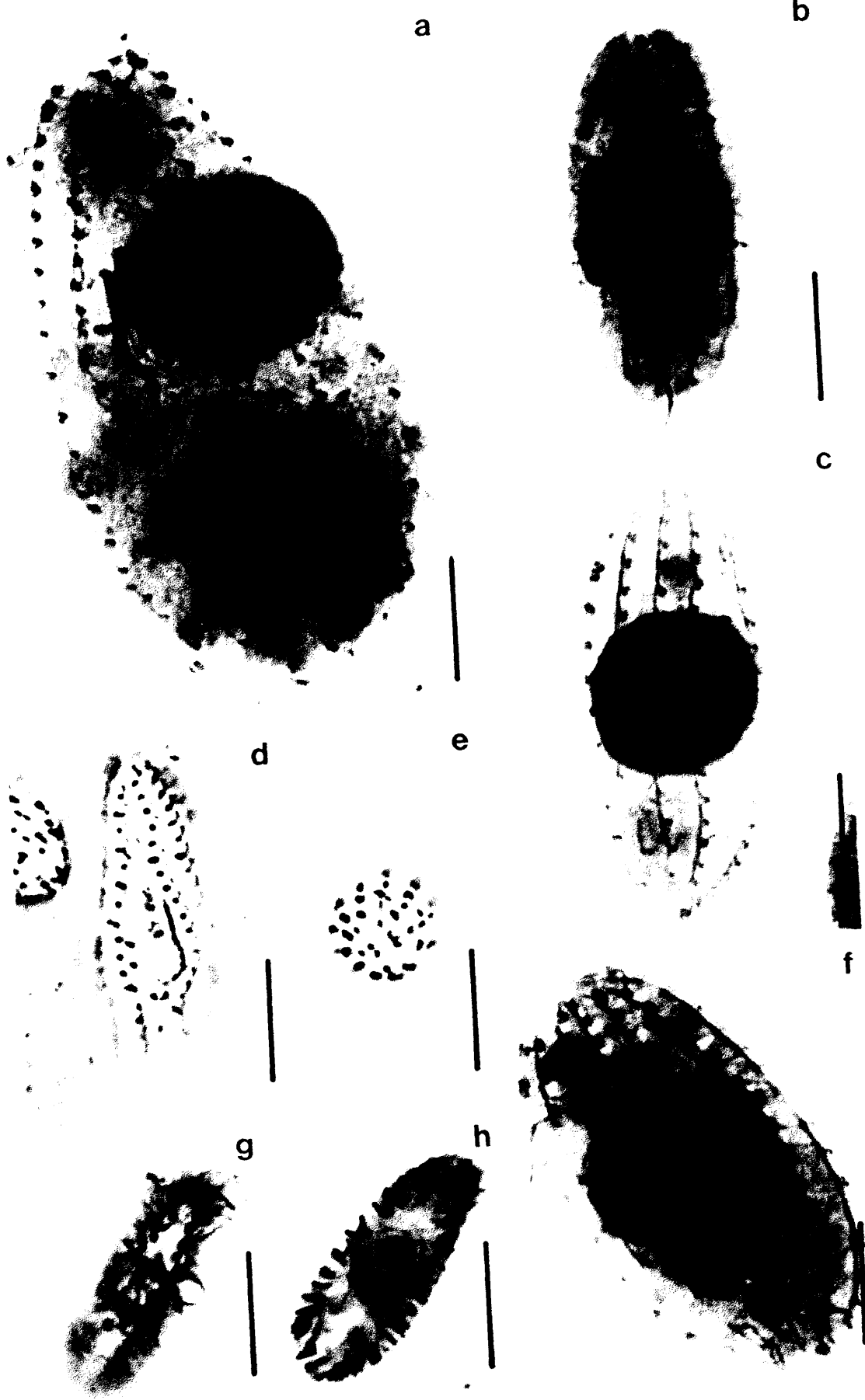


Lámina 7.- Clon Parauronema acutum. Objetivo 10x.
Escala: 10 μ m.

- a.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial, detalle del área bucal (policinetias M1, M2, M3 y parte de la haplocinetia).
- b.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial, detalle del área bucal (M1, M2). Xenosomas muy impregnados en el citoplasma celular.
- c.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase estacionaria. Detalle del área bucal y la ciliación somática.
- d.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase estacionaria. Detalle de la ciliación somática dorsal.

a



b



c



d

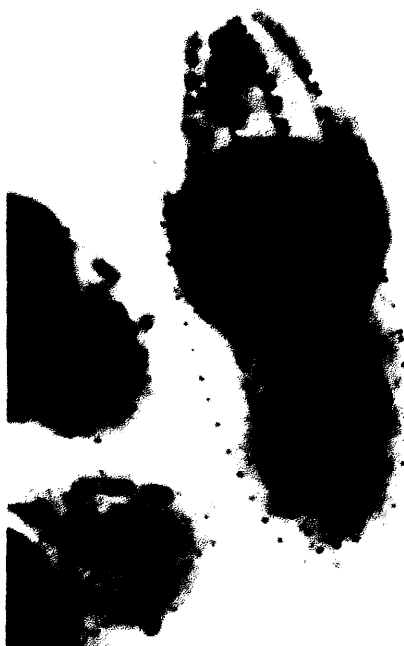


Lámina 8.- Clon Parauronema acutum. Objetivo 100x.
Escala: 10 μ m.

- a.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Detalle del macronúcleo (Ma) y xenosomas (Xe).
- b.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Detalle de parte del área bucal (M1, M2, M3 y haplocinetia).
- c.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Célula completa en fase estacionaria. Detalles del área ventral.
- d.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalles del área bucal, región anterior celular y polo posterior.
- e.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Polo posterior celular.
- f.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Polo anterior celular.
- g.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Región antero-dorsal celular.
- h.- Impregnación con la técnica de protargol. Parte de la infraciliación y ciliación somática y bucal es visible en este clon.

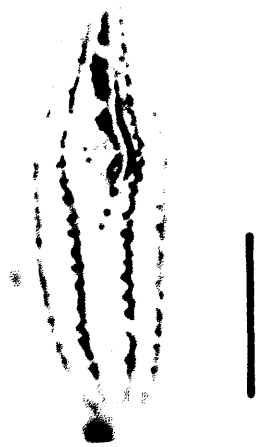
a



b



c



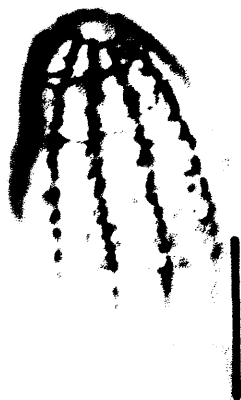
d



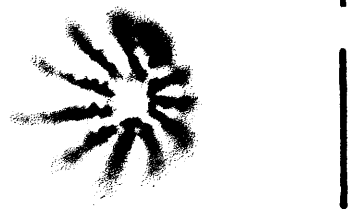
e



g



f



h



Lámina 9.- Clon Parauronema acutum: microscopía electrónica de barrido.

- a.- Microfotografía de célula completa de Parauronema acutum (CCAP no 1686/2) (x4000). Escala: 2 μm .
- b.- Detalle del área bucal con crestas intermembranales (Cr) (x8000). Escala: 2 μm .
- c.- Detalle del polo anterior celular (x8000). Escala: 2 μm .
- d.- Detalle del área del escutico. Las flechas indican la posición de los poros (x20000): Escala: 1 μm .
- e.- Detalle del área caudal. La flecha indica la situación del poro de la vacuola contráctil (x10000). Escala: 1 μm .



Lámina 10.- Clon Parauronema acutum: microscopía electrónica de transmisión.

- a.- Sección tangencial sobre la región anterior de una cinetia somática. Ps: saco parasómico, Mt: mitocondria gigante. Escala: 1 μm .
- b.- Sección tangencial sobre la parte posterior de una cinetia somática. Mt: mitocondria gigante, Ps: saco parasómico, T: fibras transversas. Escala: 1 μm .
- c.- Detalle cinetosomas (Ks), fibras cinetodésmicas (Kd), fibras postciliares (Pc) y transversas (T) de una cinetia somática. Escala: 0,5 μm .

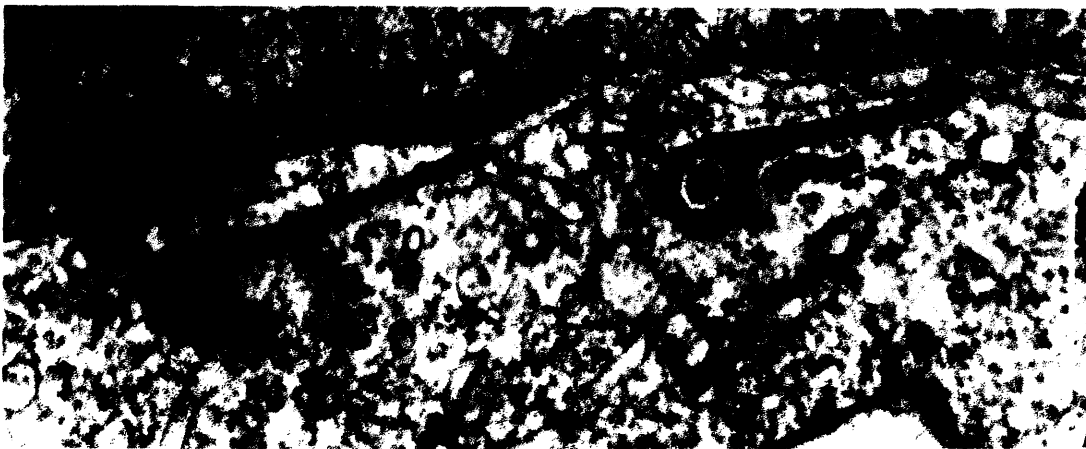


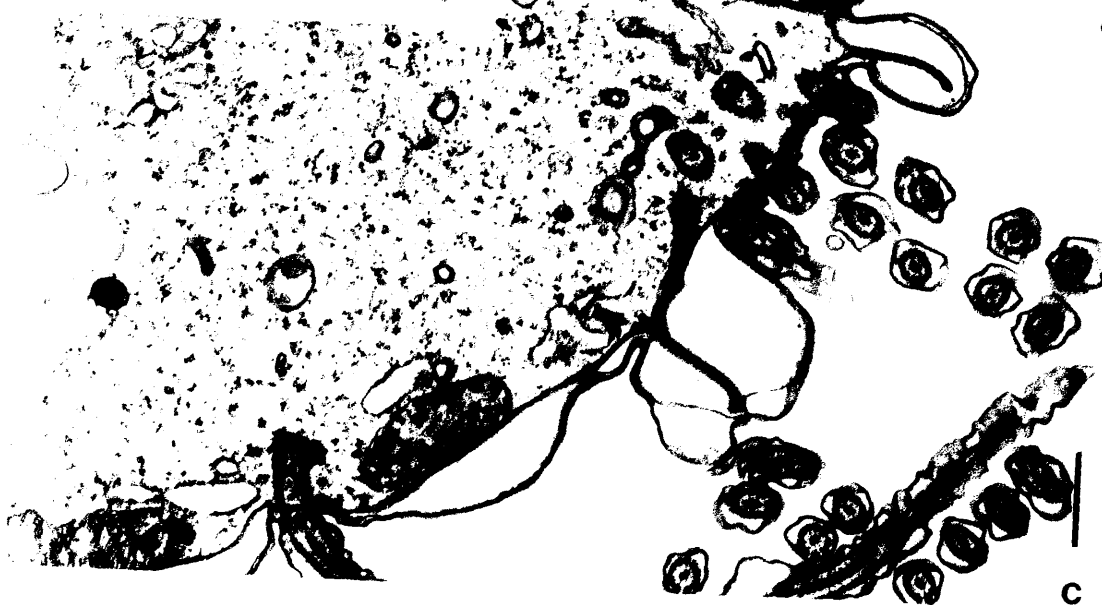
Lámina 11.- Clon Parauronema acutum: microscopía electrónica de transmisión.

- a.- Sección longitudinal de una célula completa. M1: policineta 1. M2: policineta 2. M3: policineta 3. Xe: xenosomas. Ma: macronúcleo. Ci: citostoma. Escala: 5 μm .
- b.- Detalle de sección longitudinal del área bucal. M1: policineta 1. M2: policineta 2. M3: policineta 3. Cr: cresta. Ci: citostoma Xe: xenosoma. Escala: 1 μm .
- c.- Sección transversal de una de las policinetias bucales (probablemente M2) (Po). Detalle de las crestas interpolicineticas indicadas por las flechas. Escala: 1 μm .



a

b



c

Lámina 12.- Clon X2. Objetivo 100x. Escala: 10 μ m.

- a.- Impregnación con carbonato de plata amoniacoal. Célula en fase exponencial. Detalle del macronúcleo y micronúcleo.
- b.- Impregnación con carbonato de plata amoniacoal. Célula en fase exponencial. Detalles de la infraciliación somática y bucal.
- c.- Impregnación con carbonato de plata amoniacoal. Célula en fase estacionaria. Detalles de parte de la infraciliación.
- d.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Célula en fase estacionaria.
- e.- Impregnación con la técnica de protargol. Célula en fase estacionaria.
- f.- Impregnación con la técnica de protargol. Célula en fase estacionaria.



a



b



c



d

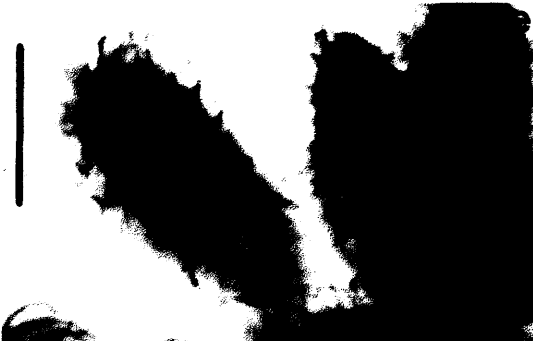


Lámina 13.- Clon Ta. Objjetivo 100x. Escala: 10 μ m.

- a.- Impregnación con carbomato de plata amoniaca. Célula en fase exponencial.. Detalles de infraciliación somática y bucal (M3 y parte de la haplocinetia).
- b.- Impregnación con carbomato de plata amoniaca. Célula en principio de la fase exponencial. Detalle de área bucal e infraciliación somática.
- c.- Impregnación con carbomato de plata amoniaca. Célula en principio de la fase exponencial. Detalle de macronúcleo. Ningun micronúcleo se observó.
- d.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Célula en fase estacionaria.
- e.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Célula en fase estacionaria.
- f.- Impregnación con la técnica de protargol. Célula en fase estacionaria.
- g.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Célula en fase estacionaria.
- h.- Impregnación con la técnica de protargol. Célula en fase estacionaria.

a



b



c



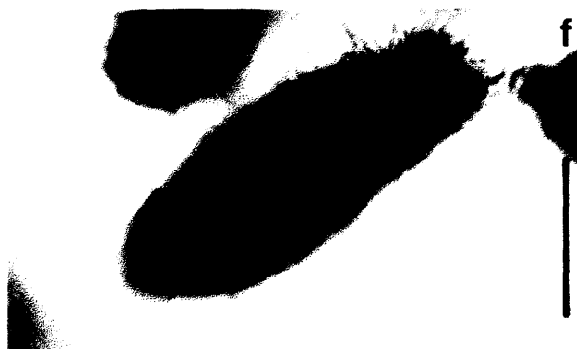
d



e



f



g



h



Lámina 14.- Clon AD1. Objetivo 100x. Escala: 10 μ m.

- a.- Impregnación con carbonato de plata amoniacoal. Célula en fase exponencial. Región ventral celular. Detalles de la infraciliación somática y bucal.
- b.- Impregnación con carbonato de plata amoniacoal. Células en fase exponencial. Región ventral celular. Detalles de la infraciliación somática y bucal.
- c.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Célula en fase estacionaria. Región ventral celular. Detalles del área bucal e infraciliación somática.
- d.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Célula en fase estacionaria. Detalles del área bucal.
- e.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Célula en fase estacionaria. Detalles del área bucal.
- f.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Célula en fase estacionaria. Región dorsal celular.
- g.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Región antero-ventral celular y polo anterior celular.
- h.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Polo posterior celular.
- i.- Impregnación con la técnica de protargol. Célula en fase estacionaria.
- j.- Impregnación con la técnica de protargol. Célula en fase estacionaria.



a



b



c



f



d



e



g



h



Lámina 15.- Clon AD2. Objetivo 100x. Escala: 10 μ m.

- a.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Región ventral celular. Detalles de la infraciliación somática y bucal.
- b.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Detalle del macronúcleo. Ningún micronúcleo se pudo observar.
- c.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Región ventral celular. Detalles de la infraciliación somática y bucal.
- d.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Región ventral celular. Detalles del área bucal.
- e.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Región ventral celular. Detalles del área bucal.
- f.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Región ventral celular. Detalles del área bucal.
- g.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Región ventral celular. Detalles del área bucal.
- h.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Polo posterior celular.
- i.- Impregnación con la técnica de protargol. Célula en fase estacionaria.
- j.- Impregnación con la técnica de protargol. Célula en fase estacionaria.

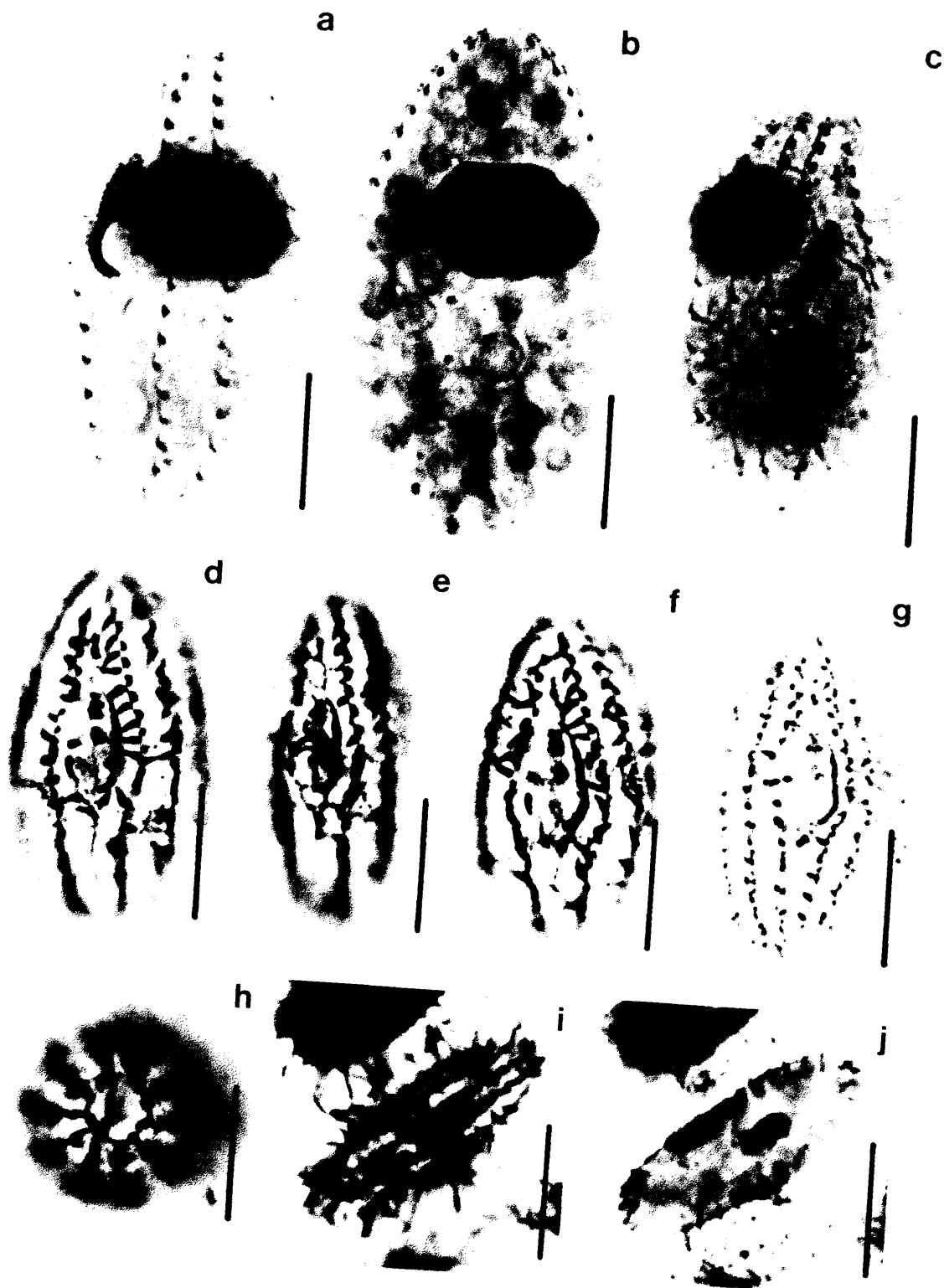


Lámina 16.- Clon **AE21**. Objetivo 100x. Escala: 10 μ m.

- a.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Región ventral celular. Detalles de la infraciliación somática y bucal.
- b.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Detalle de macronúcleo y micronúcleo.
- c.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Detalle de la infraciliación del área bucal.
- d.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Región ventral celular. Detalles del área bucal.
- e.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalles del área bucal.
- f.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Polo posterior celular.
- g.- Impregnación con la técnica de protargol. Célula en fase estacionaria.
- h.- Impregnación con la técnica de protargol. Célula en fase estacionaria.

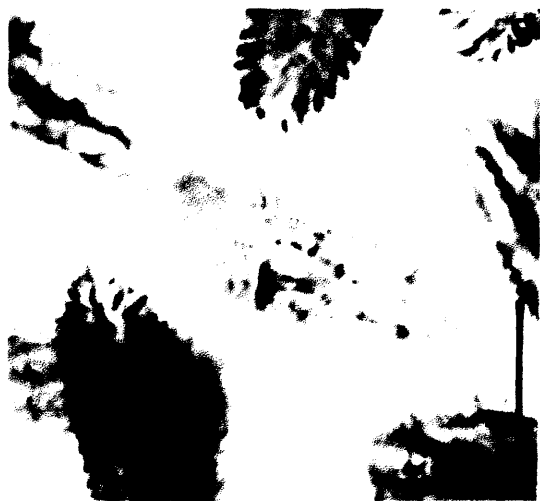
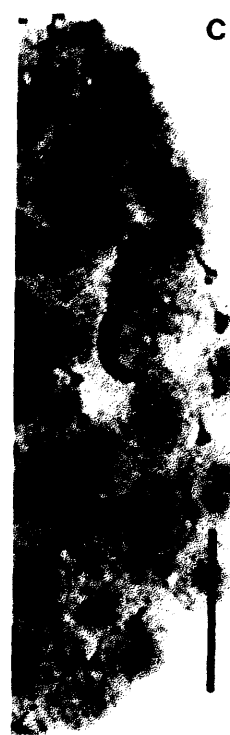
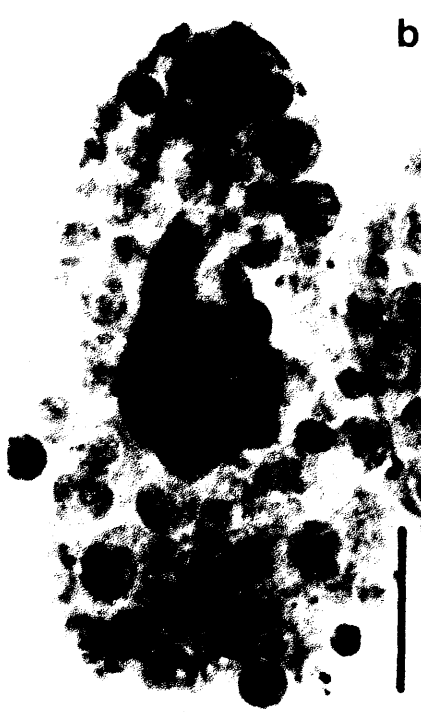


Lámina 17.- Clon AE22. Objetivo 100x. Escala: 10 μ m.

- a.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Detalle de M1 y parte de la infraciliación somática ventral.
- b.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Región ventral celular. Detalles de la infraciliación somática y bucal.
- c.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase estacionaria. Región ventral celular. Detalles de la infraciliación somática y bucal.
- d.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalles del área bucal.
- e.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalles del área bucal.
- f.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalles del área bucal.
- g.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalles del área bucal.
- h.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Polo posterior celular.
- i.- Impregnación con la técnica de protargol. Célula en fase estacionaria.
- j.- Impregnación con la técnica de protargol. Célula en fase estacionaria.

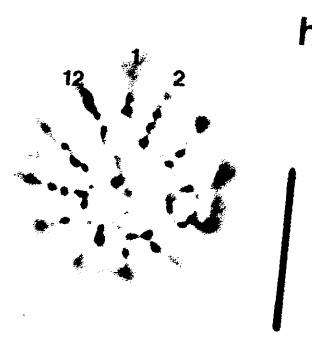
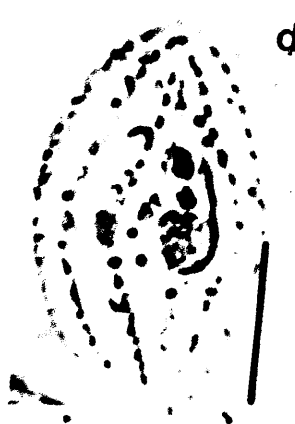


Lámina 18.- Clon AE22. Objetivo 100x. Escala: 10 μ m.

- a.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Detalles de la infraciliación somática y bucal.
- b.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase estacionaria. Detalles de la infraciliación somática y bucal.
- c.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Detalle del macronúcleo. Ningún micronúcleo se pudo observar.
- d.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase estacionaria. Detalles de la infraciliación somática y bucal.
- e.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalles del área bucal.
- f.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalles del área bucal.
- g.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Polo posterior celular.



Lámina 19.- Clon SWi1. Objetivo 100x. Escala: 10 μ m.

- a.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Detalles de la infraciliación somática y bucal.
- b.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase estacionaria. Detalles de la infraciliación somática y bucal.
- c.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Detalles de la infraciliación somática y bucal.
- d.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Detalles de la infraciliación somática y bucal.
- e.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Región antero-ventral celular y polo anterior celular.
- f.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Polo posterior celular.

a



b



c



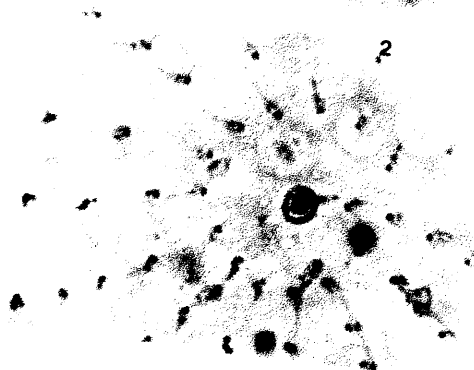
d



e



f



2

1

14

Lámina 20.- Clon SW11. Objetivo 100x. Escala: 10 μ m.

- a.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Detalle de macro y micronúcleo.
- b.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Detalle de la región bucal.
- c.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Detalle del polo anterior celular.
- d.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalles del área bucal.
- e.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalles del área bucal e infraciliación somática ventral.
- f.- Impregnación con la técnica de protargol. Célula en fase estacionaria.
- g.- Impregnación con la técnica de protargol. Célula en fase estacionaria.

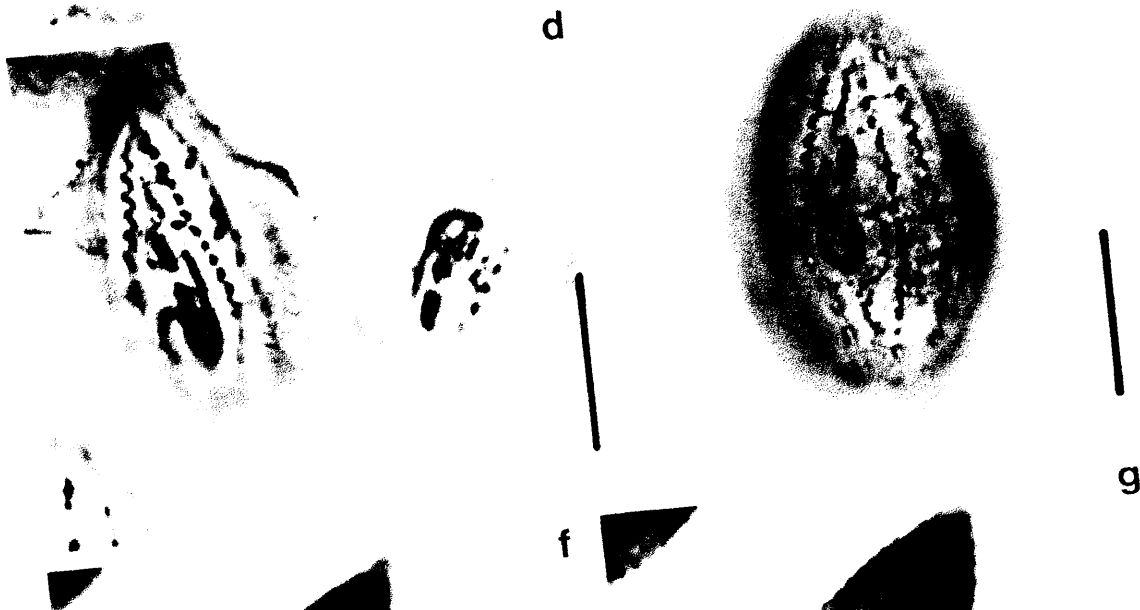
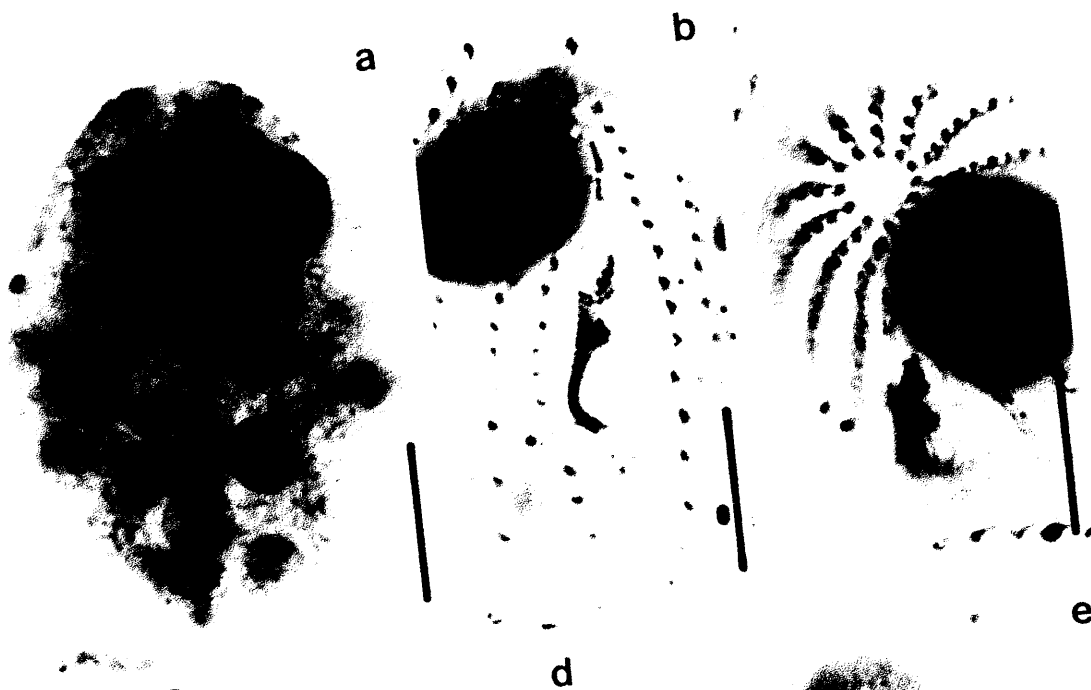


Lámina 21.- Clon C11. Objetivo 100x. Escala: 10 μ m.

- a.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Detalle del macronúcleo. Ningún micronúcleo se pudo observar.
- b.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Detalle del área bucal e infraciliación somática ventral.
- c.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase estacionaria. Detalle del área bucal e infraciliación somática ventral.
- d.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase estacionaria. Detalle del macronúcleo. Ningún micronúcleo se pudo observar.
- e.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalles del área bucal e infraciliación somática ventral.
- f.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalles del área bucal e infraciliación somática ventral.
- g.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Polo posterior celular.
- h.- Impregnación con la técnica de protargol. Célula en fase estacionaria. En este caso se puede observar parte de la región bucal ligeramente teñida.
- i.- Impregnación con la técnica de protargol. Célula en fase estacionaria.

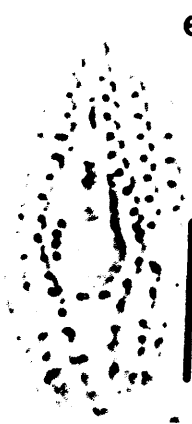
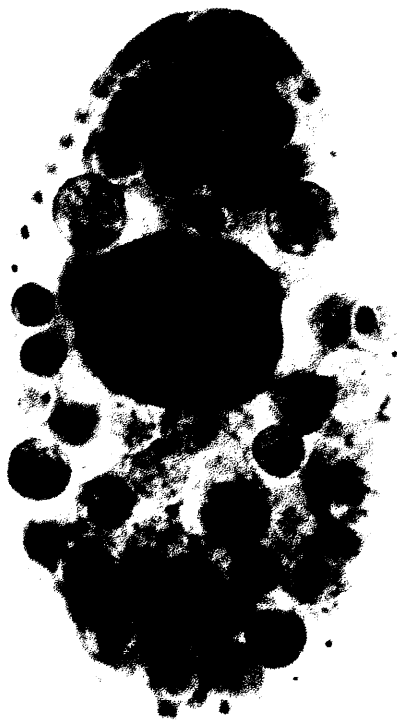


Lámina 22.- Clon BBCIL. Objetivo 100x. Escala: 10 μ m.

- a.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase estacionaria. Detalle del área bucal e infraciliación somática ventral.
- b.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase estacionaria. Detalle del área bucal e infraciliación somática ventral.
- c.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase estacionaria. Detalle del macronúcleo y micronúcleo.
- d.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalles del área bucal e infraciliación somática ventral.
- e.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalles de la región antero-ventral y parte del polo anterior.
- f.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalles del área bucal e infraciliación somática ventral.
- g.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalles del área bucal e infraciliación somática ventral.
- h.- Impregnación con la técnica de protargol. Célula en fase estacionaria.

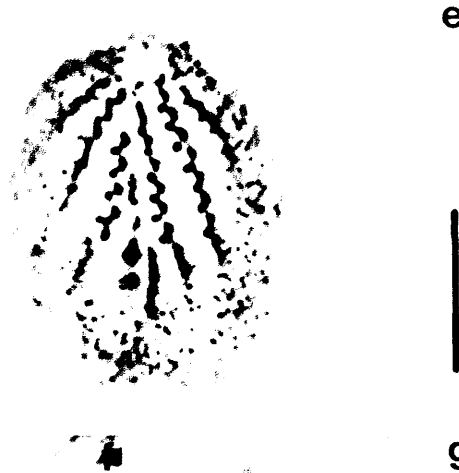
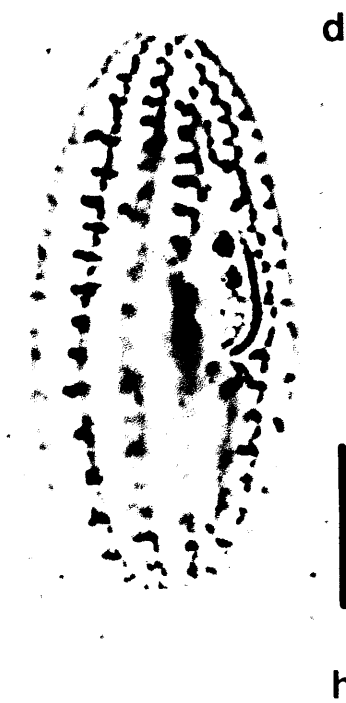
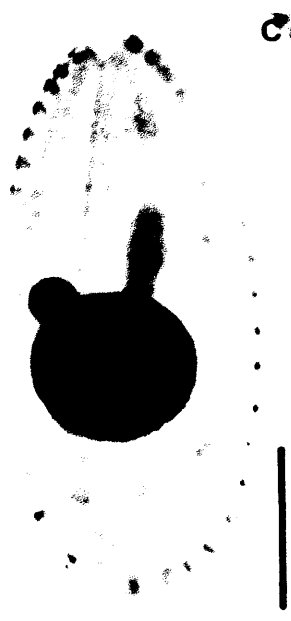


Lámina 23.- Clon Cil7. Objetivo 100x. Escala: 10 μ m.

- a.- Impregnación con carbonato de plata amoniactal. Célula en fase exponencial. Detalle del área bucal e infraciliación somática ventral.
- b.- Impregnación con carbonato de plata amoniactal. Célula en fase estacionaria. Detalle del área bucal e infraciliación somática ventral.
- c.- Impregnación con carbonato de plata amoniactal. Célula en fase exponencial. Detalle del macronúcleo y micronúcleo.
- d.- Impregnación con carbonato de plata amoniactal. Célula en fase estacionaria. Detalle del macronúcleo y micronúcleo.

a



b



c



d

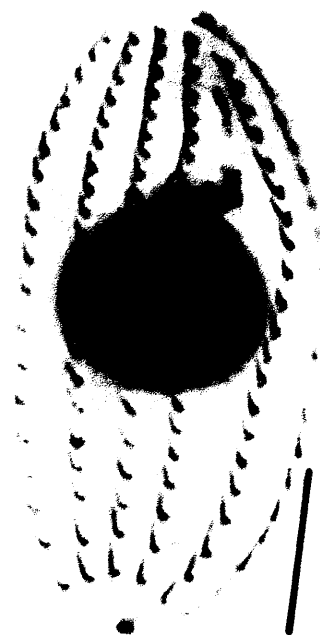


Lámina 24.- Clon Cil7. Objetivo 100x. Escala: 10 μ m.

- a.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase estacionaria. Infraciliación somática dorsal.
- b.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase estacionaria. Detalle del área bucal e infraciliación somática ventral.
- c.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalles del área bucal e infraciliación somática ventral.
- d.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Detalle del polo posterior celular. la flecha indica la situación de la vacuola contráctil, al final de la segunda cinetia somática.
- e.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalles del área bucal e infraciliación somática ventral.
- f.- Impregnación con la técnica de protargol. Célula en fase estacionaria.
- g.- Impregnación con la técnica de protargol. Célula en fase estacionaria. Detalle de macronúcleo y micronúcleo.



a



b



d



e



f



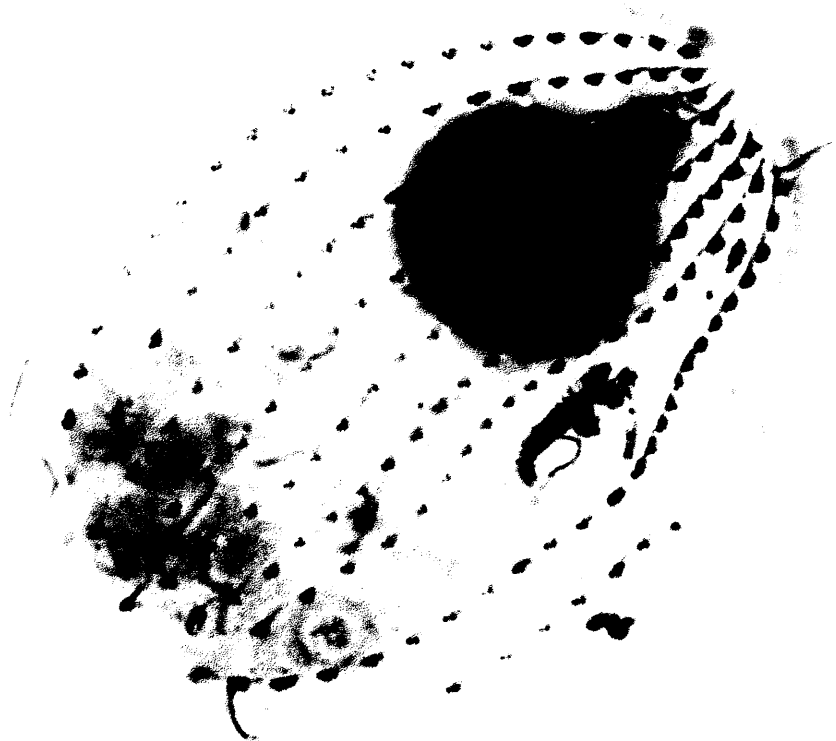
g



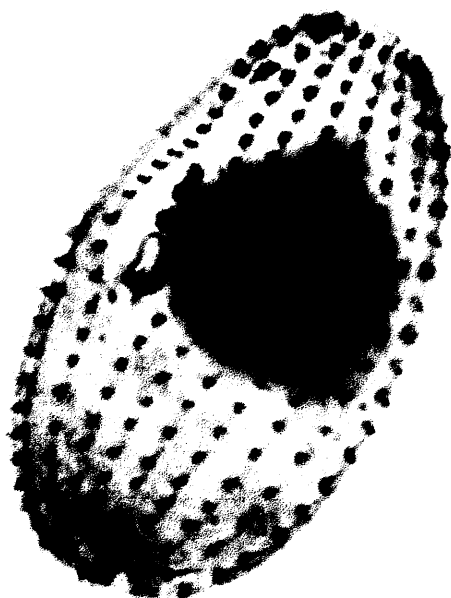
Lámina 25.- Clon Cil3. Objetivo 100x. Escala: 10 μ m.

- a.- Impregnación con carbonato de plata amoniacoal. Célula en fase exponencial. Detalles del área bucal e infraciliación somática ventral. Poro de la vacuola contráctil al final de la segunda cinetia somática.
- b.- Impregnación con carbonato de plata amoniacoal. Célula en fase estacionaria. Detalle del área bucal e infraciliación somática ventral.
- c.- Impregnación con carbonato de plata amoniacoal. Célula en fase estacionaria. Detalle del área bucal e infraciliación somática ventral.

a



b



c



Lámina 26.- Clon Cil3. Objetivo 100x. Escala: 10 μ m.

- a.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Célula en fase exponencial. Detalles del área bucal e infraciliación somática ventral.
- b.- Impregnación con carbonato de plata amoniacal. Detalle de macronúcleo y micronúcleo.
- c.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Polo anterior celular.
- d.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Polo posterior celular. Las cinetias somáticas no terminan todas al mismo nivel y los extrusomas que quedan teñidos entre medias enmascaran su observación.
- e.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Célula en fase estacionaria. Detalle del área bucal e infraciliación somática ventral.
- f.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalle del sistema argentófilo en una zona postero-dorsal celular (ver Lámina 28e).
- g.- Impregnación con nitrato de plata (técnica de Chatton-Lwoff). Detalle del área postero-ventral celular y el citopigio.

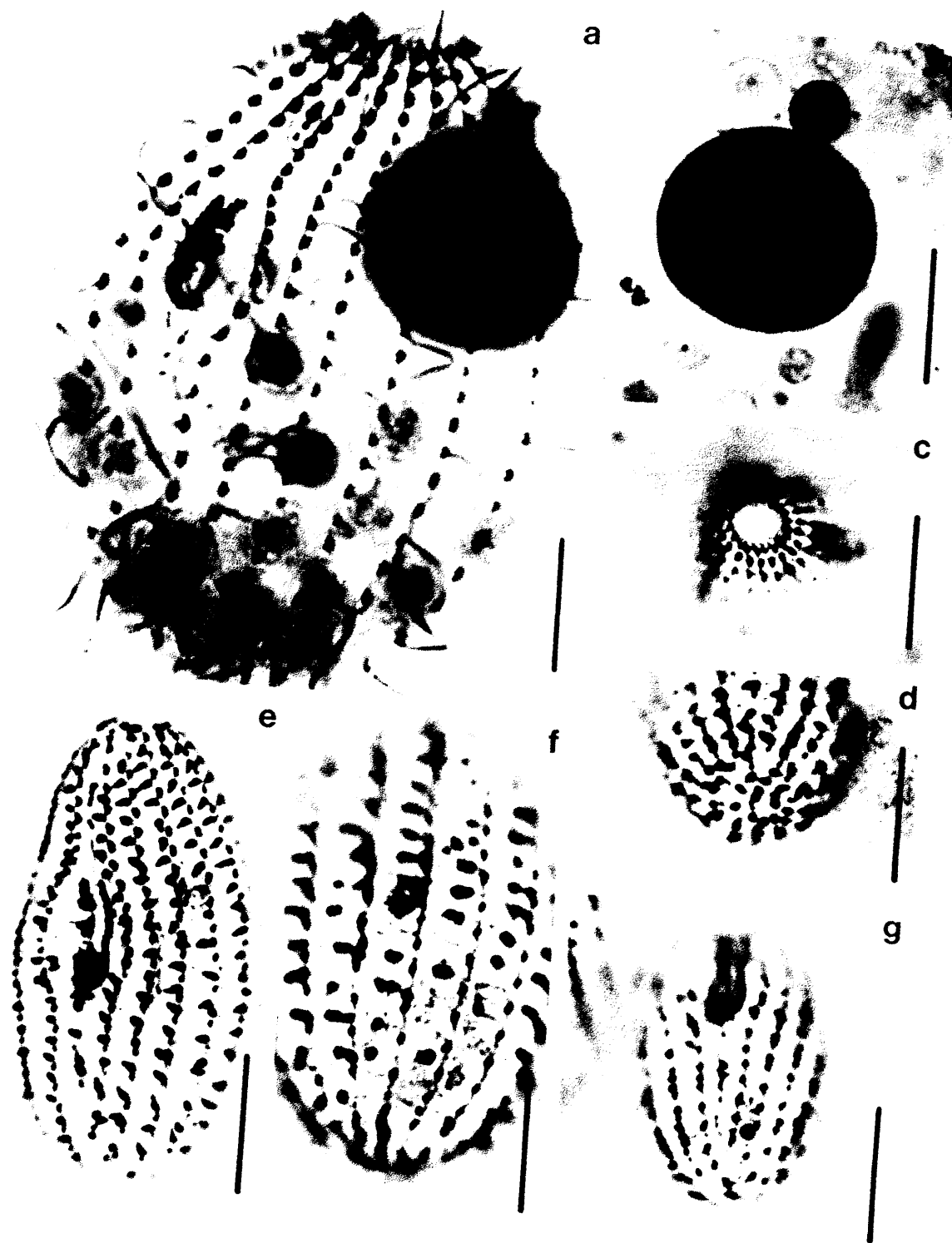


Lámina 27.- Clon Cil3. Objetivo 100x. Escala: 10 μm .

- a.- Impregnación con protargol. Macro y micronúcleo.
- b.- Impregnación con protargol. Superficie celular, áreas dorsal y ventral.
- c.- Impregnación con protargol. Macro y micronúcleo.
- d.- Impregnación con protargol. Superficie celular, áreas dorsal y ventral.

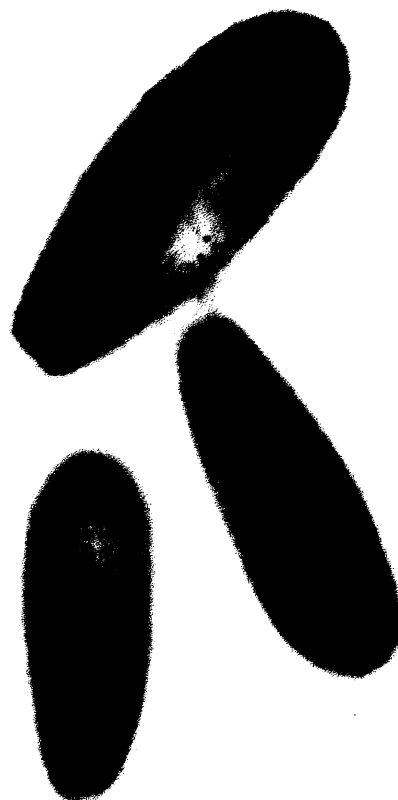


Lámina 28.- Clon C13 (Uronema elegans): microscopía electrónica de barrido

- a.- Célula completa de Uronema elegans (CCAP no 1686/2). Cr: crestas intermembranales (x3500). Escala: 2 μm .
- b.- Detalle del área bucal. Cr: crestas intermembranales (x6000). Escala: 2 μm .
- c.- Detalle del polo anterior celular (x6000). Escala: 2 μm .
- d.- Detalle del área caudal y Pv: Poro de la vacuola contráctil. (x6000). Escala: 2 μm .
- e.- Detalle de área subpelicular (x6000). Escala: 2 μm .
- f.- Detalle del área del escutico. Las flechas indican los poros en dicha área (x20000). Escala: 1 μm .

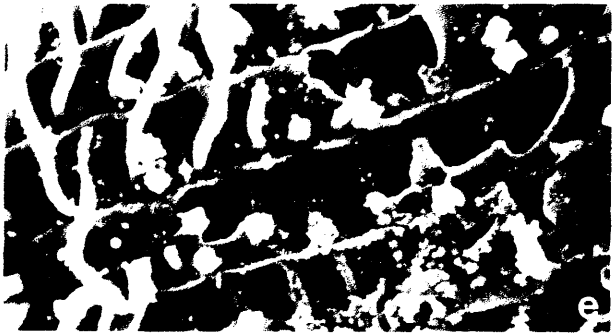


Lámina 29.- Clon Cil3 (Uronema elegans): microscopía electrónica de transmisión

- a.- Área bucal desde la policinetia M1 hasta la M3, incluyendo parte de la línea ciliada de la haplocinetia y una cresta intermembranal (Cr). Escala: 2 μm .
- b.- Detalle de policinetia M1, cinetosomas y sacos parasómicos (Ps) interpuestos. Escala: 1 μm .
- c.- Detalle de policinetias M2 y M3 y cresta intermembranal (Cr). Escala: 1 μm .
- d.- Detalles de las policinetias M2, M3, haplocinetia (PA). Línea de sacos parasómicos (Ps) externos en la haplocinetia. Escala: 1 μm .
- e.- Composición cinetosómica de la policinetia M2 y sacos parasómicos (Ps) entre cinetosomas. Escala: 0,5 μm .

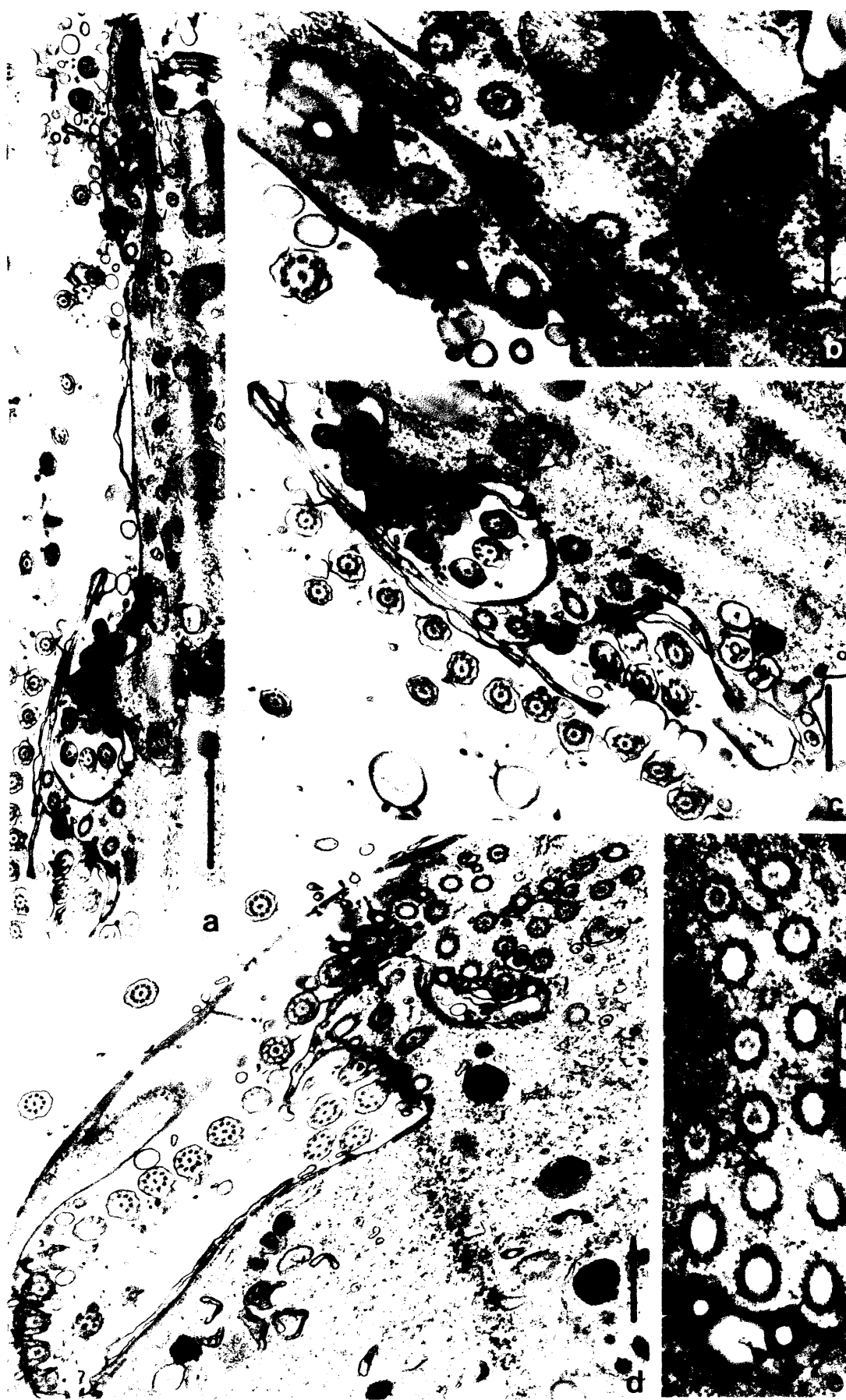


Lámina 30.- Clon Cil3 (Uronema elegans): microscopía electrónica de transmisión.

- a.- Detalle del micronúcleo (Mi) y macronúcleo (Ma). Escala: 1 μm .
- b.- Sección transversal de mucocistos (Mu). Escala: 1 μm .
- c.- Sección longitudinal de mucocisto (Mu). Escala: 1 μm .
- d.- Mitocondria (Mt). Escala: 0,5 μm .
- e.- Mitocondria (Mt). Escala: 1 μm .
- f.- Monocinetia y situación del condrioma (Mt). Escala: 1 μm .

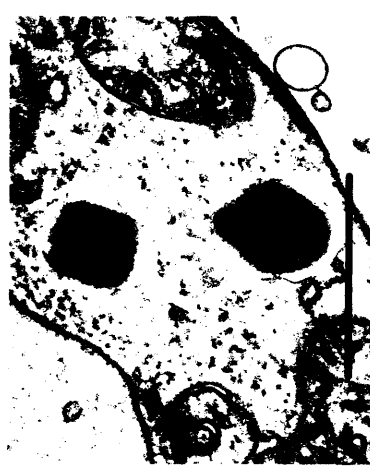
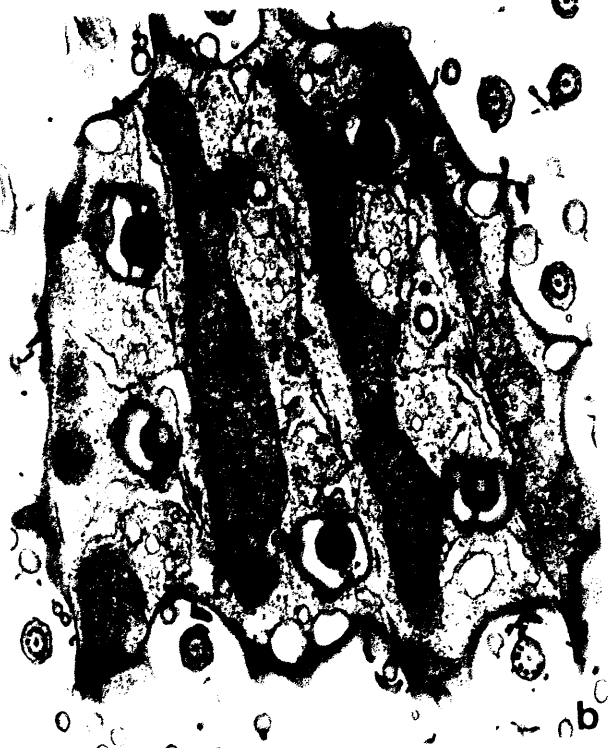


Lámina 31.- Clon Cil3 (Uronema elegans): microscopía electrónica de transmisión.

- a.- Sección superficial de la parte anterior de una de las cinetias somáticas. Escala: 1 μm .
- b.- Sección superficial de la parte posterior de tres cinetias somáticas. Escala: 1 μm .
- c.- Sección longitudinal de cilio caudal. Escala: 1 μm .
- d.- Detalle de cinetosomas, fibras cinetodésmicas (Kd), fibras postciliares (Pc) y transversas (T) en una cinetia somática. Escala: 0,5 μm .



a



b



c



d

Lámina 32.- Clon **SRBM**. Objetivo 100x. Escala: 10 μ m.

- a.- Célula completa en fase exponencial impregnada con carbonato de plata amoniacal. Detalles de la ciliación somática y bucal.
- b.- Célula impregnada con carbonato de plata amoniacal. Detalles de Macro y micronúcleo.
- c.- Célula completa en fase estacionaria impregnada con carbonato de plata amoniacal. Detalles de la ciliación somática y parte de la bucal.
- d.- Célula completa en fase exponencial impregnada con carbonato de plata amoniacal. Detalles de la ciliación somática y bucal.
- e.- Célula impregnada con nitrato de plata o técnica de Chatton-Lwoff. Detalle de la región posterior celular, ciliación somática, argiroma, citopigio y poro de la vacuola contráctil.
- f.- Célula impregnada con nitrato de plata o técnica de Chatton-Lwoff. Ciliación somática y argiroma.
- g.- Célula impregnada con protargol. Superficie celular.
- h.- Célula impregnada con protargol. Macro y micronúcleos.



a



b



c



d



e



f



g



h

Lámina 33.- Clon SRBM: microscopía electrónica de transmisión.

- a.- Detalle del área posterior de una de las cinetias somáticas, sacos parasómicos (Ps). Escala: 1 μm .
- b.- Detalle del área anterior de una de las cinetias somáticas. Escala: 0,5 μm .
- c.- Detalle de uno de los pares de cinetosomas de una cinetia somática. Escala: 0,5 μm .
- d.- Sección transversal de un cinetosoma parte de una cinetia somática. Escala: 0,5 μm .



b



d

Lámina 34.- Clon SRBM: microscopía electrónica de transmisión.

- a.- Sección tangencial sobre la superficie del área bucal, en la haplocinetia y M3. Escala: 5 μm .
- b.- Detalle de la paroral con la línea de sacos parasómicos externos. Escala: 1 μm .
- c.- Detalle de sección longitudinal de M2 y M3. Escala: 1 μm .

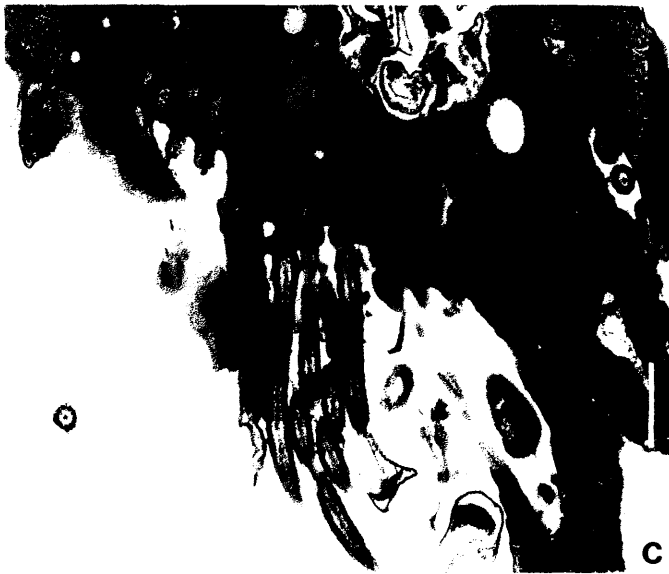


Lámina 35.- Clon Scut 2.1. Objetivo 100x. Escala: 10 μ m.

- a.- Célula completa en fase exponencial impregnada con carbonato de plata amoniacal. Detalles de la ciliación somática y bucal.
- b.- Célula completa en fase exponencial impregnada con carbonato de plata amoniacal. Detalle del condrioma entre cinetias contiguas y de la ciliación somática dorsal.
- c.- Célula completa en fase exponencial impregnada con carbonato de plata amoniacal. Detalle de macro y micronúcleo.
- d.- Célula impregnada con nitrato de plata o técnica de Chatton-Lwoff. Detalle de la región posterior celular, ciliación somática, argioma, citopigio y poro de la vacuola contráctil.
- e.- Célula impregnada con protargol. Superficie celular.
- f.- Célula impregnada con protargol. Detalle de macro y micronúcleo.
- g.- Célula impregnada con protargol. Superficie celular.
- h.- Célula impregnada con protargol. Detalle de macro y micronúcleo.



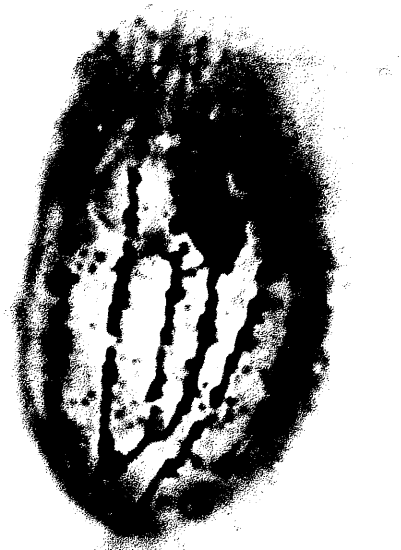
a



b



c



d

e

f

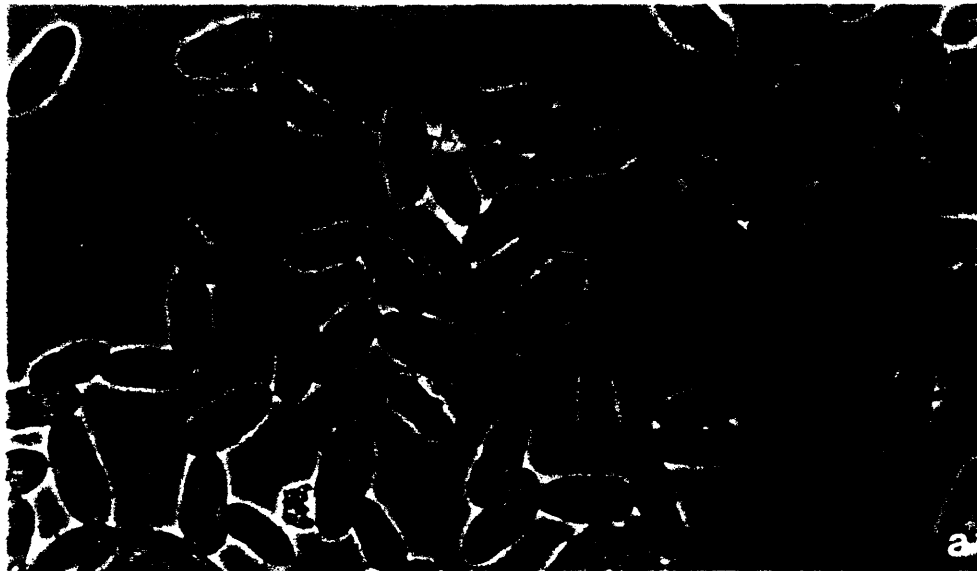
g

h



Lámina 36.- Experimento de hibridación con la sonda molecular específica de U. marinum (CCAP 1986/2) sobre una mezcla del clon C11 y P. acutum (control negativo). Objetivo x40.

- a.- Células tras el proceso de hibridación. Observación bajo contraste de fase.
- b.- Células tras el proceso de hibridación. Observación por medio de microscopía de fluorescencia a través de un bloque de filtros para la detección de rodamina (N2.1).
- c.- Células tras el proceso de hibridación. Observación por medio de microscopía de fluorescencia a través de un bloque de filtros para la detección de fluoresceína (I3).



ANEXO 1

MEDIOS DE CULTIVO

FWNA-Agar nutritivo

Agar nutritivo (Oxoid CM3) 28 g
Agua destilada 1 L
pH 7.0
Esterilización 15 minutos a 120°C.

Caldo nutritivo

Caldo nutritivo (Oxoid) 28 g
Agua destilada 1 L
pH 7.0
Esterilización 15 minutos a 120°C.

CCAP- Agua de mar artificial

Sales principales

Sales marinas sinteticas "Ultramarine" 33.6 g
Tricina 0.5 g

Soluciones stock:

1. Sales extra:

NaNO_3 15.0 g
 Na_2HPO_4 0.6 g
 K_2HPO_4 0.5 g

2. Stock de extracto de suelo:

Mezclar 1 parte de suelo tamizado y secado al aire con 2 partes de agua destilada. Hervir durante 1 hora. Filtrar a traves de un filtro tipo GF/C (Whatman). Ajustar el pH a 8 con NaOH o HCL y esterilizar en

autoclave.

Mezclar 25 ml de extracto de suelo y 3.75 ml de las sales extra (solución 1) y las sales principales, enrasando a 1 litro con agua destilada. Ajustar el pH a 7.6-7.8 con NaOH 1N o HCl 1N. Esterilizar en autoclave.

El medio es modificado con la adición de leche en polvo (10 g/L)

TECNICAS DE IMPREGNACIÓN

Técnica de Carbonato de plata amoniacal

Reactivos

Formol comercial puro (40%)

Bacto-peptone (Difco).

Esta solución al 4% se preparo en un matraz de enrase de 100 ml, se ayudo la solubilización, colocando el matraz en un sonicador, y entonces se añadieron 25 gotas de formol al 40%, para evitar su contaminación.

Piridina pura.

Agua destilada.

Solución de carbonato de plata amoniacal

50 ml de una solucion al 10% de nitrato de plata (AgNO_3)

150 ml de una solución al 5% de carbonato sodico decahidrato ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)

Estas dos soluciones preparadas separadamente se mezclan en el mismo erlenmeyer, produciéndose un precipitado lechoso. Entonces se añade gota a gota una solución de amonio hasta que dicho precipitado desaparece. Finalmente se añade una solución al 5% de carbonato sódico decahidratado ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) hasta alcanzar un volumen final de 850 ml.

En los casos en los que Na_2CO_3 -anhidro fue utilizado, las concentraciones de las demás soluciones fueron ajustadas. Así la solución de Na_2CO_3 -anhidro debe ser 1.85% correspondiendo a una solución al 5% de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

Técnica de Chatton-Lwoff

Reactivos

Fijador de Champy

7 partes CrO_3 (solución 1% aq.)
7 partes $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (solución 3% aq.)
4 partes OsO_4 (solución 2% aq.)

Fijador de Da Fano

CoNO_3	1 gr
NaCl	1 gr
Formol	10 ml
Agua destilada	90 ml

Gelatina al 15 %.

La gelatina una vez pesada se mezcla con el volumen necesario de agua destilada fría y

entonces se colocó al baño maría a 40°C hasta su completa disolución. se distribuyó en viales de 2 ml y se mantuvo bajo condiciones de refrigeración (4°C) hasta su utilización.

Nitrato de plata solución al 3% (peso/volumen)

Alcohol isopropílico

Xileno

Protargol

Reactivos

Solución concentrada de Bouin (Society of Protozoologists, 1985)

Formol comercial puro (40%) se saturó con sales de ácido pícrico durante un mínimo de 24 horas mezclando y agitando la solución de vez en cuando.

Se añadió ácido acético glacial a esta solución de picro-formol inmediatamente antes de su utilización, en una proporción del 1% con respecto al volumen final de muestra a fijar más solución de picro-formol.

Albumina de Mayer

Esta fue preparada con clara de huevo y glicerol concentrado (98-100%) en una proporción de 1:1. La técnica utilizada para la preparación previa de la clara de huevo fue la descrita por Foissner (1991).

Permanganato potásico al 0.2%

Acido oxálico al 2.5%

Protargol al 0.4%

El reactivo de protargol fue depositado en la superficie del volumen de agua destilada correspondiente ya en la jarra de tinciones, dejando disolver sin remover.

Solución reveladora

Fue preparada en el momento de su utilización como un solución al 1% de hidroquinona en una solución al 5% de sulfato sódico anhidro.

Tiosulfato sódico 2.5%

Solución acidificada de Lugol

[Steedman, 1985 #279; Ohman, 1991 #283]

Esta solución se preparo disolviendo en 1000 ml de agua destilada en ebullición 10 g de KI y 5 g de I₂ durante una hora. Una vez las sales estuvieron disueltas se dejo enfriar y entonces se añadieron 100 ml de acido acético glacial.

La principal ventaja de este fijador, es que además de fijar las células, las tiñe ligeramente de un color marrón facilmente detectable, lo que facilita el conteo de éstas, por esta razón fue el fijador elegido para llevar a cabo los experimentos diseñados para la obtención de curvas de crecimiento de todos los ciliados.

Esta solución fijadora, en el caso de ser utilizada para la fijación de muestras sobre las que se iba a

llevar a cabo conteo directo de bacterias, fue filtrada a traves de filtros de polycarbonato esteriles Millipore de 0.2 μm de tamaño de poro y almacenada en una botella de vidrio borosilicatado esteril.

La concentración de fijador utilizada para ciliados y bacterias fue de 2% (volumen/volumen).

MICROSCOPIA ELECTRONICA

Microscopía electrónica de barrido

Fijador modificado de Parducz [Parducz,1967]

Este fijador fue preparado mezclando seis partes de una solución al 2% en agua de mar (en el caso de los ciliados marinos) o agua destilada (en el caso de los ciliados de agua dulce) de O_4Os con una parte de una solución a saturación de HgCl_2 .

Tampón cacodilato sódico 0.1 M (pH=7.4)

El tampón cacodilato fue mantenido como solución stock 0.2 M, siendo diluida en el momento de su utilización a la mitad.

Microscopía electrónica de transmisión

Soluciones fijadoras

Glutaraldehido al 2.5% en tampón de cacodilato sódico, fue preparado diluyendo un vial de solución de glutaraldehido al 25% diez veces con tampón cacodilato 0.1M. Para el caso de los ciliados marinos este fijador fue suplementado con sucrosa hasta un 6% concentración final.

Tetróxido de osmio al 1% en tampón de cacodilato
sódico 0.1M. Esta solución fue mantenida en
oscuridad permanentemente.

Resina de Spurr

Fue preparada segun Spurr,A.R (1969). La
composición standar utilizada fue:

ERL 4206	10.0 g
DER 736	6.0 g
NSA	26.0 g
S-1	0.4 g

En algún caso la cantidad utilizada de DER 736
fue disminuida a 5 g, consiguiendo de esta
manera un bloque más duro.

HIBRIDACIONES CON Sonda MOLECULAR

Portas pretratados

Los portas se lavaron en una solución al 10% de
KOH en etanol al 95% durante 1 hora a
temperatura ambiente, tras lo cual fueron
aclarados en agua destilada y dejados secar al
aire.

Una vez secos se cubrieron con una solución de
gelatina al 0.1% en una solución de cromo-
potasio-sulfato(?????) al 0.01% a 70°C. Este
proceso se llevó a cabo sumergiendo y agitando
los portas en dicha solución uno o dos minutos
y dejando secar al aire. El proceso se repitió
al menos 5 veces.

Solución fijadora Paraformaldehido/PBS

Solución al 4% de paraformaldehído en PBS (Tampón fosfato) 0.2 M a pH 7.2. El paraformaldehído fue disuelto a 70°C en constante agitación.

Esta solución fue preparada inmediatamente antes de su utilización.

Tampón de hibridación

NaCl	0.9 M
NaPO ₄	0.5 mM
EDTA	5 mM
Ficoll	2 mg/ml
PVP	2 mg/ml
BSA	2 mg/ml
Poly A	1 mg/ml

Las soluciones de NaCl, NaPO₄ y EDTA fueron esterilizadas previamente en autoclave a 120°C durante 15 minutos. Las soluciones de Ficoll, PVP y BSA, fueron esterilizadas por filtración, a través de filtros de membrana de 0.2 µm de tamaño de poro. La solución de PolyA fue preparada con agua destilada esterilizada previamente.

Tampón de lavado

NaCl	0.9 M
SDS	0.1 %